

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

Recherches sur le mode de coloration du pain bis

PAR MM. GABRIEL BERTRAND ET W. MUTERMILCH

Le pain bis étant préparé avec la farine qui renferme du son, tandis que le pain blanc s'obtient avec la farine pure, on a pensé que l'aspect du premier était dû à la dissolution d'une matière colorante contenue dans la pellicule extérieure du grain.

Cette explication fort simple a conduit à essayer la fabrication du pain blanc avec du froment débarrassé de sa pellicule colorée au moyen du dépiqueage. Comme la séparation de la farine et du son par le procédé ordinaire de mouture entraîne l'exclusion d'une certaine quantité de gruaux intermédiaires, on espérait réaliser ainsi un rendement plus élevé en pain blanc. Or, on s'est aperçu que le pain fabriqué par la nouvelle méthode était absolument bis.

Mège-Mouriès a donné une explication partielle de ce fait en montrant que la coloration grise, loin d'être due à la dissolution d'une matière colorante du son, était provoquée, au cours de la panification, par l'action d'une substance comparable à un ferment¹.

Cette substance, qu'il a appelée *céréaline*, est contenue dans une couche de cellules spéciales, dite quelquefois couche à aleurone, située à la périphérie de l'amande. Pendant la mouture, la couche à aleurone se sépare de l'amande, mais reste adhérente aux débris de l'enveloppe. Elle fait donc partie intégrante du son².

1. *Comptes rendus Ac. d. Sc.*, t. XLII, p. 4122 (1856); t. XLIV, p. 40 et p. 44 (1857); t. XLVIII, p. 426 (1858); aussi : *Mémoires Soc. nat. d'Agric.*, t. GV, p. 180 (1860).

2. On trouvera une description détaillée du grain de froment, accompagnée d'une planche en couleur, dans les *Compt. rend. Ac. Sc.*, t. XLIV, p. 450 (1857).

Si on fait macérer dans l'eau les pellicules de son et les gruaux intermédiaires qui renferment toujours une certaine quantité de son, la céréaline se dissout et peut ensuite être éliminée par filtration. Ou bien encore, si on introduit le son et les gruaux dans la pâte levée, c'est-à-dire peu de temps avant la cuisson, la céréaline n'a plus le temps d'agir. On a ainsi deux moyens, proposés par Mège-Mouriès, d'utiliser le grain de blé d'une manière presque intégrale dans la fabrication du pain blanc.

En quoi consiste l'action de la céréaline? Comment cette substance détermine-t-elle la coloration du pain bis?

D'après les observations de Mège-Mouriès, la céréaline saccharifie l'amidon et transforme le glucose produit en acide lactique, puis, si le contact est prolongé, en acide butyrique.

Elle donne au *lait de son* la propriété de s'aigrir et de se colorer sous l'influence de l'air.

Enfin, elle altère profondément le gluten en donnant, parmi d'autres produits, de l'ammoniaque, une matière dont la couleur brune rappelle l'ulmine et une substance azotée capable de transformer le sucre en acide lactique.

On voit, par cette description, donnée en 1857, que des microbes divers intervenaient dans les transformations attribuées à la céréaline. Il était donc impossible de savoir, d'après les expériences de Mège-Mouriès, si le brunissement du pain bis était dû à une substance particulière du type des ferment solubles ou bien à des microorganismes dont, parmi d'autres hypothèses, le son, riche en phosphates, aurait favorisé le développement.

A la suite de la découverte des oxydases, Boutroux a repris, en 1895, l'étude de la coloration du pain bis¹. D'après ce savant, le son renferme de la laccase et une substance de nature indéterminée sur laquelle réagit le ferment soluble. « Une macération de son, faite à froid à l'abri de l'air, stérilisée par filtration au filtre Chamberland, est blonde. Au contact de l'air pur de germes, elle brunit peu à peu et devient, au bout de plusieurs semaines, presque noire.

« Un chauffage à 100° fait perdre à l'extrait de son la propriété de brunir à l'air.

1. *Comptes rendus Ac. Sc.*, t. CXX, p. 934 (1895).

« Enfin, de l'extrait de son ayant été traité par l'alcool, on a obtenu un précipité et une liqueur. Le précipité a été lavé à l'alcool, puis séché dans le vide à froid. La liqueur a été évaporée, dans le vide à froid, jusqu'à siccité. Les deux substances, reprises par l'eau, ne brunissent pas à l'air séparément. Mélangées, elle brunissent à l'air d'une manière manifeste, quoique moins intense que l'extrait de son naturel. »

En poursuivant les expériences de Mège-Mouriès et de Boutroux, nous avons, à notre tour, trouvé quelques faits nouveaux. Les premiers se rapportent aux ferment solubles du son; ils montrent, en particulier, que la diastase oxydante reconnue par Boutroux n'est pas de la laccase, mais une substance du type, découvert depuis par l'un de nous, de la tyrosinase¹. Les autres font connaître le chromogène, son origine et la manière dont les diastases du son interviennent dans le brunissement du pain bis.

Voyons d'abord comment on procède à l'extraction des diastases :

Du son de froment, mélangé avec quatre parties d'eau, est placé dans un flacon que l'on remplit autant que possible et que l'on bouche. On peut prendre de l'eau saturée de chloroforme, mais cela n'est pas indispensable. Après quelques heures de macération, ou mieux une journée, en prenant la précaution de mettre le flacon dans une glacière, on passe le mélange à la presse, à travers un linge. On centrifuge ensuite le liquide pour éliminer les particules en suspension.

La solution limpide décantée est alors additionnée de trois fois son volume d'alcool à 95 0/0; on centrifuge de nouveau; le précipité est lavé une fois à l'alcool à 80 0/0, puis délayé dans l'eau distillée. On laisse en contact pendant quelque temps et l'on sépare, toujours à la centrifuge, les matières protéiques coagulées et la solution diastasique.

Celle-ci est traitée par trois à quatre volumes d'alcool; le précipité qui se forme est rassemblé, lavé à l'alcool fort, enfin desséché dans le vide, sur l'acide sulfurique. Le rendement est de 0,8 0/0 environ.

1. G. BERTRAND. *Compt. rend. Ac. de Sc.*, t. CXXII, p. 1215 (1896); t. CXXIII, p. 463 (1896) et *Bulletin Soc. chim.*, 3^e série, t. XV, p. 793 et p. 4218 (1896). Dans ce dernier mémoire, page 4220, ligne 19, lire : 1 est à 4.500, au lieu de : 1 est à 4, soit 500.

Ce précipité absolument blanc, soluble dans l'eau, ne contient pas de laccase. En effet, si on l'introduit dans une solution aqueuse de gayacol, il ne produit pas trace de tétragayacoquinone : on ne voit apparaître ni précipité ni coloration rouge, même après plusieurs jours¹.

L'émulsion de résine de gayac, préparée avec une teinture récente de résine, devient tout au plus verdâtre. Avec l'hydroquinone, on obtient seulement une coloration rose faible.

L'absence de laccase dans le précipité ne provient pas de ce que le traitement a détruit cette oxydase ou l'a laissée dans les liquides hydroalcooliques, car la macération aqueuse de son, filtrée ou non à la bougie de porcelaine, puis additionnée de gayacol, ne donne pas la réaction de la tétragayacoquinone. Cette macération est également dépourvue d'action notable sur la résine de gayac.

Le précipité diastasique renferme, par contre, une tyrosinase. Pour le démontrer, sans courir le risque d'une intervention microbienne, on filtre la solution aqueuse à travers une bougie Chamberland, puis on la répartit dans plusieurs tubes stérilisés,

Il est alors facile de constater :

1^o Que la solution seule ne prend au contact de l'oxygène atmosphérique aucune coloration;

2^o Qu'elle se colore successivement en rose, puis en rouge cerise et finalement en noir, si on y ajoute, aseptiquement, une solution de tyrosine. Une durée de quelques heures suffit pour obtenir cette série de colorations ;

3^o Que le phénomène de coloration de la tyrosine n'a plus lieu si on opère dans un tube d'où la totalité de l'oxygène, gazeux et dissous, a été extraite à l'aide d'une trompe à mercure ;

4^o Enfin, qu'il n'y a pas non plus de coloration de la tyrosine, même en présence de l'air, lorsque la solution diastasique a été maintenue 5 minutes dans un bain-marie à + 100°.

Cette tyrosinase n'est pas la seule substance diastasique contenue dans le précipité extrait du son de froment. Elle est accompagnée de plusieurs autres, parmi lesquelles la leptomine

1. G. BERTRAND, Action de la laccase sur le gayacol, *Compte rend. Ac. Sc.*, t. CXXXVII, p. 4269 (1903) et *Bull. Soc. chim.*, 3^e série, t. XXXI, p. 211 (1904).

de Raciborsky¹ appelée aussi peroxydase ou mieux peroxydias-tase.

La peroxydiastase réduit l'eau oxygénée en présence de certains corps organiques : l'hydroquinone, le pyrogallol, le gayacol, la résine de gayac, etc. Dans cette réaction, le corps organique s'empare de l'atome d'oxygène et donne le même dérivé quinonique qu'on obtiendrait si on l'oxydait par l'air — c'est-à-dire par l'oxygène moléculaire — en présence de la laccase².

C'est ainsi que la solution aqueuse préparée avec le précipité diastasique du son donne, quand on y ajoute un peu d'eau oxygénée et, cela, malgré l'exclusion totale de l'oxygène, gazeux ou dissous :

Avec le gayacol : une production presque instantanée de tétragayacoquinone, reconnaissable à la coloration rouge du liquide, bientôt suivie de la précipitation d'une poudre micro-cristalline de couleur pourpre :

Avec l'hydroquinone : une cristallisation rapide de quinhydrone ;

Avec le pyrogallol : un dépôt cristallisé de purpurogalline ;

Enfin avec la teinture de résine de gayac : une coloration bleu intense.

La tyrosinase du son de froment est beaucoup plus résistante à la chaleur que celle du champignon.

Comme le laccase de l'arbre à laque, il faut la chauffer jusque vers 190° pour lui enlever rapidement et complètement sa propriété oxydante. Si on la chauffe à une température inférieure, par exemple vers 95°, elle ne perd son activité que d'une façon transitoire ; après plusieurs jours de conservation à la température ordinaire, on assiste, en quelque sorte, à la reviviscence de la diastase : la solution reprend le pouvoir d'oxyder la tyrosine.

La nouvelle tyrosinase est, par suite, différente de celle des champignons ; c'est une thermo stabil-tyrosinase, l'autre étant au contraire une thermolabil-tyrosinase³.

1. *Bericht. d. d. botan. Gesells.*, t. XVI, p. 119 (1898).

2. Voir une analyse de G. BERTRAND dans *Bull. Inst. Pasteur*, t. II, p. 398 (1904).

3. La peroxydiastase du son est encore plus stable que la tyrosinase : une très courte ébullition tue celle-ci mais n'entrave pas complètement l'action de celle-là ; pour tuer la peroxydiastase, une ébullition de quelques minutes est nécessaire ; c'est donc aussi une diastase relativement thermostable.

Ces faits préliminaires étant établis, nous allons pénétrer plus loin dans le phénomène de brunissement du pain bis et montrer qu'il s'agit là de deux actions diastasiques successives; la première élaborant, en quelque sorte, la substance qui est oxydée dans la seconde.

Les expériences suivantes montrent d'abord que, contrairement à ce qu'on aurait pu supposer, la macération aqueuse de son ne renferme ni tyrosine ni substance analogue colorable par la tyrosinase.

On fait macérer pendant quelques heures une partie de son de froment avec 4 à 5 parties d'eau, puis on sépare le liquide à la presse, on le filtre à la bougie Chamberland et on l'introduit dans des tubes à essai stérilisés munis d'un tampon d'ouate. Les tubes sont ensuite chauffés dans un bain-marie bouillant pendant 5 minutes pour détruire toutes les diastases en dissolution.

Si on ajoute alors, après refroidissement, un peu de tyrosinase, il se conservent sans prendre aucune coloration.

Nous nous sommes servi de deux sortes de tyrosinase. La première provenait du son; on l'a obtenue comme il a été dit plus haut. La seconde a été extraite par la glycérine d'un champignon particulièrement riche: *Russula Queletii* Fr. Au moment du besoin, l'extrait glycériné¹ a été dilué avec un peu d'eau et filtré à la bougie.

La substance qui, dans la macération aqueuse de son, se colore à l'air sous l'influence de la tyrosinase, est produite, au cours d'une transformation antérieure, par une autre diastase.

Pour le démontrer, on introduit la macération aqueuse de son, après son passage au filtre de porcelaine, dans des tubes stérilisés d'une forme spéciale, permettant l'extraction des gaz à la trompe à mercure. Afin de favoriser le départ de l'air dissous, on maintient le liquide des tubes quelques minutes à l'ébullition, pendant le vide, en chauffant très doucement; enfin, lorsque l'extraction est complète, on scelle à la lampe.

Une partie des tubes est alors chauffée cinq minutes dans un bain-marie bouillant; elle est destinée à servir de témoin.

1. Pour préparer cet extrait, on débarrasse le champignon de son épiderme coloré, on le coupe en petits morceaux et on le met dans un flacon avec deux fois son poids de glycérine à 30°B. On agite de temps en temps les premiers jours et on conserve dans une armoire, à l'abri de la lumière.

On la place ensuite, avec le reste des tubes, dans une étuve à $+ 35^{\circ}$. Après un certain temps, variable de quelques jours à plusieurs semaines, on procède à l'examen comparatif des tubes. Ceux qui n'avaient pas été chauffés sont maintenus cinq minutes vers 100° . Ils ne diffèrent plus alors des tubes témoins qu'en ce que les diastases — sauf la tyrosinase¹ — ont pu y exercer leur action.

En ouvrant les tubes, on constate : 1^o qu'il n'y a de coloration, au seul contact de l'air, dans aucun des liquides ; 2^o qu'après avoir ajouté de la tyrosinase (soit du son, soit des champignons), le liquide des tubes témoins reste sans changement, tandis que celui des autres tubes prend très vite une coloration rose, devenant rouge cerise, puis brun foncé. Comme on ne peut savoir d'avance le temps qu'il est nécessaire de laisser les tubes à l'étuve, il faut opérer par tâtonnements. C'est pourquoi on a préparé une série de tubes chauffés et non chauffés. De temps en temps, on examine un couple de ces tubes. Quand l'expérience est réussie, on obtient une coloration rapide et intense par la tyrosinase.

Ainsi, le brunissement de l'extrait de son résulte bien de deux actions diastasiques successives : la première met en liberté un chromogène incolore ayant les caractères essentiels de la tyrosine ; la seconde fixe l'oxygène atmosphérique sur ce chromogène et donne finalement un produit brun noir.

Quelle est la nouvelle substance diastasique, celle qui agit dans la première phase du phénomène ? D'après nos expériences, c'est une protéase : elle hydrolyse, avec production de tyrosine, non seulement les matières protéiques du son et celles du gluten, mais encore la caséine du lait de vache. On sait que ces diverses matières protéiques sont parmi les plus riches en tyrosine.

La protéase du son de froment, que l'on pourrait appeler *gluténase*, est inactive en milieu alcalin ; elle agit en milieu neutre et, beaucoup mieux encore, en milieu acide. Les acides organiques (acétique, oxalique) et les acides minéraux (chlorhydrique) peuvent servir à activer son pouvoir digestif. C'est ainsi que dans une solution, renfermant deux millièmes d'acide chlorhydrique, nous avons obtenu en quelques jours une pro-

1. Et aussi la peroxydiastase, puisqu'il n'y a pas de peroxyde d'hydrogène.

duction de tyrosine qui, pour être aussi manifeste en milieu neutre, exigerait deux semaines.

Voici comment nous nous sommes assurés de la mise en liberté de la tyrosine par l'action de la gluténase sur les matières protéiques.

Une petite quantité de ces matières, environ un demi-gramme, était introduite avec quelques centimètres cubes d'eau dans un tube simplement bouché avec un tampon d'ouate. Après stérilisation à l'autoclave à $+ 115^{\circ}$ et refroidissement, on ajoutait un peu de solution préparée avec le précipité diastasique du son et filtrée à la bougie Chamberland. On procédait aussitôt à l'extraction totale de l'air, libre ou dissous, à l'aide de la trompe à mercure et l'on scellait le tube. La digestion était ensuite obtenue par un séjour plus ou moins prolongé à l'étuve, vers $+ 35^{\circ}$. Lorsqu'on la jugeait suffisante, on plongeait le tube dans un bain-marie bouillant, pendant cinq minutes; on le laissait refroidir, puis on l'ouvrait pour essayer sur son contenu l'action de la tyrosinase. Lorsque la digestion avait été suffisamment prolongée, on obtenait la série caractéristique des colorations.

La tyrosinase étant très sensible à l'action des acides — et aussi des alcalis, — il faut neutraliser les liquides avec le plus grand soin avant d'y ajouter le ferment soluble. On termine en produisant une infime acidité acétique.

Les matières protéiques du son qui ont servi dans ces expériences ont été obtenues en même temps que le précipité diastasique par l'action de l'alcool sur la macération aqueuse du son.

Comme le contact de l'alcool les a coagulées, elles restent insolubles lorsqu'on reprend le précipité par l'eau, pour en extraire les diastases. En raison de leur état, il faut une quinzaine de jours pour en obtenir une digestion notable avec la gluténase; la caséine du lait de vache est digérée beaucoup plus rapidement.

La double réaction diastasique qui détermine la coloration du pain bis ne représente pas un phénomène isolé: elle est le type de toute une série de transformations qu'il y a lieu de supposer analogues, parmi lesquelles il faut citer les *mélanoses* animales étudiées chez plusieurs insectes, chez la seiche, chez

le cheval atteint de certaines tumeurs, par Biedermann¹, par von Fürth et Schneider², par Przibram³ et surtout par Ges-sard⁴. Dans aucun de ces exemples, on n'avait déterminé le mode de production du chromogène; on avait seulement démontré l'intervention d'une tyrosinase, reconnu dans quelques cas la présence de la tyrosine.

L'étude de la coloration du pain bis permet d'interpréter d'une manière plus complète et plus précise les diverses méla-noses.

1. *Pflügers Archiv*, t. LXXII, p. 405 (1898).

2. *Beiträge z. chem. Physiol. Path.*, t. I, p. 229 (1901).

3. Cité dans le mémoire précédent.

4. *Comp. rend. Ac. Sc.*, t. CXXXVI, p. 631 et p. 4086 (1903).

Idem, t. CXXXIX, p. 644 (1904).

DES TROPISMES DU " BACTERIUM ZOPFII " KURTH

Deuxième note

PAR LE DR EDMOND SERGENT.

Ma première note avait paru¹ et les expériences rapportées ici étaient en cours d'exécution, lorsque j'eus connaissance d'un travail paru en 1906 de H. C. Jacobsen², qui, dans le même temps que H. Zikes et moi-même, mais tout à fait indépendamment, s'était occupé des curieuses cultures du *Bacterium zopfii* en gélatine.

Jacobsen conclut que le *B. Z.* possède la propriété de réagir à une excitation extérieure, qui consiste dans la tension élastique de la gélatine. Il réagit différemment aux forces de pression et à celles d'étirement. Jacobsen propose de désigner cette propriété sous le nom d'elasticotropie.

Mes expériences confirment celles de Jacobsen, et la seule raison qui me fait penser qu'il est peut-être intéressant de les publier, est qu'elles arrivent aux mêmes conclusions que celles de cet auteur, par une technique et des procédés différents.

Dans une première note j'étais arrivé à constater que les cultures du *B. Z.* sur gélatine tenue verticale obéissent à des tropismes commandés par la pesanteur et aussi par le voisinage d'élevures de la surface de la gélatine (en particulier des bords de cette surface).

I

C'est ce qu'on peut voir dans la photographie de la figure 1. (Gélatine inclinée sur un petit côté de boîte de Roux.)

1. *Ann. Inst. Pasteur.*, t. XX, déc. 06, pp. 4005-1017.

2. Ueber einen richtenden Einfluss beim Wachstum gewisser Bakterien in Gelatine, *Centrabl. f. Bakt.*, etc., II, t. XVII, 1906, nos 1-2, pp. 53-64.

On peut supprimer l'action des bords par le procédé suivant : ayant fait solidifier la gélatine sur le petit côté d'une boîte de Roux (comme dans la figure 4), on chauffe légèrement sur la flamme du bœuf Bünzen ce côté de la boîte. Le bloc de gélatine



Fig. 4.

se décolle et il est facile de le faire glisser par un brusque mouvement sur un des grands côtés de la boîte où il repose sur sa face convexe. On immerge la boîte dans de l'eau froide et le brusque refroidissement assure l'adhésion de la gélatine au verre dans la position voulue. On possède ainsi des blocs de gélatine affectant la forme de cylindres coupés par un plan. Les blocs étant collés au verre sur une certaine longueur de leur

face hémicylindrique, leur surface plane est, par contre, libre de tout point de contact avec les parois de verre.

De tels blocs sont représentés dans les figures 2 et 3.



Fig. 2.

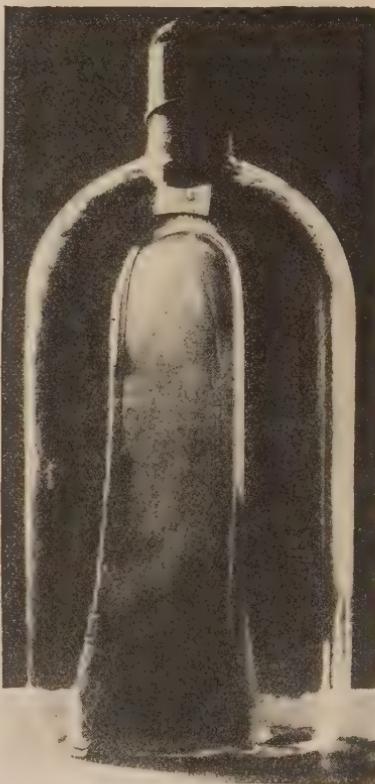


Fig. 3.

Dans la figure 4, on a utilisé de la gélatine plus molle (8 0/0).

Dans la figure 5 (gélatine dure, à 12 0/0), un des bords de la surface plane touche et adhère au verre.

La figure 6 est dans le même cas, avec de la gélatine molle (8 0/0).

Enfin, dans la figure 7, le bloc de gélatine est collé non seulement le long de son dos convexe, mais appuie sa base et son sommet aux parois de la boîte.

L'examen des cultures du *B. Z.* sur ces différents blocs de

gélatine impose cette observation que leurs directions semblent en rapport avec l'état d'étirement ou de tassement de la gélatine.

Figures 2 et 3. — La face plane est tendue verticalement par suite de ses



Fig. 4.



Fig. 5.

adhérences supérieures et inférieures : les filaments du *B. Z.* cheminent verticalement (parallèlement à la direction de la force).

Figure 4. — La gélatine molle (trop aqueuse) ne s'est pas collée assez vite au verre. Le bloc qui avait primitivement les dimensions exactes de ceux de la figure 1 s'est tassé, raccourci et élargi. Ici plus d'étirement, mais au contraire pression de haut en bas : les filaments se dirigent horizontalement (c'est-à-dire perpendiculairement à la direction de la force).

Figure 5. — L'étirement n'est pas seulement vertical, il résulte aussi de l'adhérence que d'un bord de la face plane au verre : les filaments, comme il

a été vu précédemment, prennent la direction de la composante de ces deux forces (oblique à 45° sur la verticale).



Fig. 6.



Fig. 7.

Figure 6. — Dans les mêmes conditions, avec de la gélatine molle, on constate en plus l'effet du tassemement.

Figure 7. — Enfin, si des précautions sont prises pour que l'étirement et le tassemement soient réduits au minimum, on constate que la plus grande partie de la culture du *B. Z.* n'est sollicitée par aucun tropisme.

II

Des constatations analogues peuvent être obtenues avec des cultures en stries sur de la gélatine couvrant le grand côté des boîtes de Roux.

Soit, figure 8, une de ces cultures verticales normales, où la strie a été tracée au milieu de la surface.



Fig. 8.

Figure 9. — Une culture ensemencée de la même façon est maintenue inclinée (la flèche indiquant la verticale). On voit que le tassemement de la gélatine vers le bas a déplacé la strie d'ensemencement, et que les filaments du *B. Z.* ont cheminé *seulement* sur la surface étirée.

La figure 10 montre qu'un corps étranger (tube de verre), immergé dans la gélatine, provoque un étirement de cette gélatine parce qu'elle adhère à lui, et modifie ainsi la direction des filaments (voir la 4^e note).

III

Le phénomène de la tension de la surface de la gélatine, peu facile à observer directement sur des tubes de petit diamètre, peut être mis en évidence par l'expérience suivante :



Fig. 9.

Si l'on verse de la gélatine à 8 0/0 dans une cuvette un peu grande, on s'aperçoit qu'au bout d'un certain temps la dessiccation a amené à sa surface la formation d'une véritable membrane adhérant fortement sur les bords aux côtés de la cuvette. Cette membrane, de consistance cornée, devient imperméable, et la masse sous-jacente reste demi-fluide, étant soustraite à l'action de la dessiccation. Si la cuvette est relevée verticalement, la masse gélatineuse peu consistante se tasse à la partie inférieure, où la membrane est fortement pressée, tandis que pour la même raison sa partie supérieure est étirée (fig. 11).

La figure 3 montre un aspect fréquent de la membrane étirée; elle présente de petites rides perpendiculaires à la direction de la force de tension. L'examen au microscope montre (fig. 12) les filaments qui cheminent dans le sens de cette force et coupent à angle droit les rides.



Fig. 10.

IV

CONCLUSIONS.

Mes expériences confirment donc l'existence chez le *Bacterium zopfii* d'une sensibilité particulière à la propriété d'élasticité possédée par la gélatine.

Quand la gélatine est étirée, les filaments suivent la direction de la force de tension.

Quand elle est comprimée, les filaments suivent une direction perpendiculaire à la force de pression (fig. 4), ou même la culture est nulle (fig. 9).

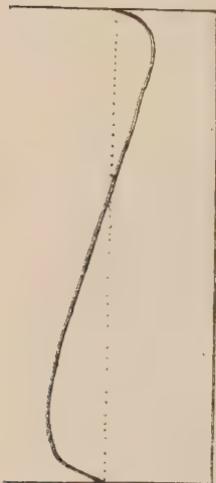


Fig. 44.



Fig. 42.

Il convient de remarquer que, dans les conditions habituelles, l'élasticité de la gélatine réagit surtout contre la force de la pesanteur. Comme exception, on peut citer la dessiccation des bords des masses de gélatine, qui est suivie d'un étirement de celle-ci, due à son élasticité.

Mais la pesanteur étant la cause la plus ordinaire de mise en jeu de l'élasticité de la gélatine, on peut dire que souvent le tropisme du *B. Z.* se trouve agir comme un géotropisme.

NOUVELLE CONTRIBUTION A L'ETUDE DE l'hématozoaire de l'Écureuil (*Hæmamœba vassali* Lav.)

PAR LE DR J.-J. VASSAL.

Nous apportons quelques faits nouveaux concernant un hématozoaire endoglobulaire pigmenté d'un écureuil de l'Annam (*Sciurus griseimanus*) que nous avons décrit il y a 2 ans¹ et que M. Laveran a nommé *Hæmamœba Vassali*².

Depuis la publication de notre premier mémoire, nous avons examiné 96 écureuils de provenance suivante : Province de Nha-Trang (Annam), 88; province de Phanrang (d^o), 6; France, 2.

Ceux de France appartenaient à l'espèce *Sciurus vulgaris*. Ceux d'Annam comprenaient 3 espèces différentes : *Sciurus griseimanus* M. Edw., *Sciurus vittatus* Rolfes, *Sciurus* sp.. Le tableau suivant résume les résultats de mes examens de sang.

Sciurus griseimanus : 24 sains contre 40 infectés = 62,5 0/0 d'infectés;

Sciurus vittatus : 25 sains contre 3 infectés = 10,7 0/0;

Sciurus sp. ? : 1 sain contre 2 infectés;

Sciurus vulgaris : 2 sains : pas d'infecté.

L'espèce semble jouer un grand rôle. Il est évident que, dans le Sud-Annam, le *Sciurus griseimanus* est beaucoup plus sensible que le *S. vittatus* par exemple.

Mais on ne saurait encore se prononcer définitivement, car il y a en Annam de très nombreuses espèces d'écureuils. Je ne connais, à ce jour, que le sang de 3 espèces annamites. Des chasseurs indigènes ont été expédiés à différentes reprises dans les forêts de l'intérieur. Ils m'ont rapporté quelques dépouilles intéressantes que M. O. Thomas, du *British Museum*, a bien voulu étudier et déterminer ; mais, point de lames de sang pouvant être utilisées.

La maladie caractérisée par la présence dans le sang de l'*Hæmamœba* (*Plasmodium*) *vassali*, peut être appelée *Plasmodiose*,

1. J.-J. VASSAL, *Ann. Inst. Pasteur*, t. XXI, avril 1905, pp. 224-234. Note prélimin. in *C. r. Soc. biologie*, 25 févr. 1905, p. 350.

2. LAVERAN, *Bull. Inst. Pasteur*, oct. 1905.

de même que les affections à piroplasmes s'appellent *Piroplasmoses*.

La plasmodiose des écureuils sera dite *P. sciurine*.

Une telle infection sanguine peut être considérable. Il n'est pas rare de prendre du sang chez un écureuil et d'assister très rapidement à une formation très riche de microgamètes. La masse sanguine est agitée de mouvements qu'on ne saurait mieux comparer qu'à ceux des préparations analogues où les trypanosomes ou les spirilles foisonnent.

Dans ces cas extrêmes, ou bien le taux parasitaire du sang diminue peu à peu et l'animal prend une forme chronique de plasmodiose, ou bien le taux se maintient et l'animal ne tarde pas à succomber.

Il y aurait donc des accès mortels et des accès qui guérissent. Comme je n'ai vu d'accès fatals que chez des écureuils capturés depuis quelques jours, je ne suis pas en état de dire s'il y a une forme aiguë de la maladie. Ce pouvait aussi bien être la terminaison d'une affection lente. En tout cas, mes sujets mouraient en cage sans qu'il y ait une modification quelconque dans le nombre et la forme des hématozoaires habituels.

Les températures des écureuils des espèces observées sont généralement comprises entre 39° et 40°.

Il n'y a pas de différences appréciables entre les courbes des animaux sains et celles des animaux malades.

Les maxima ont été de 40°,2, 40°,5, 40°,6 et 40°,7; les minima 38°, 37°,8 et 37°.

Cette dernière observation a été faite sur un *S. griseimanus* (S. 220) au moment de la mort. Dans ce cas, la plasmodiose avait été particulièrement sévère. La courbe accusa une chute en lysis qui fut très régulière et dura trois jours.

Les poids ne subissent pas de variations. L'aspect est le même, que l'animal soit atteint ou non de plasmodiose.

Les écureuils supportent d'abord très mal la captivité; mais quand ils se sont une fois départis de leur allure craintive, ils vivent fort bien en cage. A Nha-Trang, un certain nombre mouraient dans les premières semaines, soit parce que les pièges les avaient plus ou moins blessés, soit parce qu'ils ne pouvaient s'accoutumer à leur nouveau genre de vie. J'en ai rapporté quelques exemplaires d'Annam à l'Institut Pasteur de Paris.

Trois sont encore vivants après 9 mois de séjour en France.

A l'attitude et aux signes extérieurs, il n'est pas possible de faire la distinction entre les parasites et ceux qui ne le sont point.

Chez des sujets dont l'examen peut être poursuivi pendant des mois, on remarque que, lorsque la plasmodiose a été reconnue, on n'a pas de peine à la retrouver à chaque nouvelle prise de sang. Elle se maintient avec des variantes insignifiantes. La disparition des parasites de la circulation périphérique se produit parfois et le phénomène peut durer plusieurs semaines ; mais c'est plutôt une exception.

Les formes sexuées sont beaucoup plus fréquentes que les formes asexuées. Chez un grand nombre d'écureuils, je n'ai jamais observé de schizontes ; du moins quand l'observation n'a pas pu être prolongée.

Les écureuils de Nha-Trang ont continué à montrer à Paris les mêmes hématozoaires. Après 9 mois, on ne constate guère de changement : il y a des schizontes, des microgamétocytes et des macrogamètes. On ne saurait donc nier qu'il se fait des réinfections.

Elles ne paraissent pas résulter d'une inoculation surajoutée

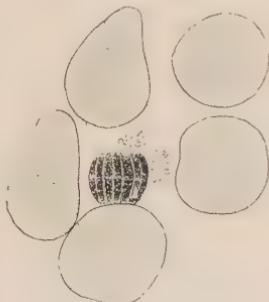


Fig. A. — Gross^t 2,000 diam. env.

de sporozoïtes par des ectoparasites ou des moustiques, mouches, etc., car alors les voisins indemnes s'infecteraient à leur tour.

Il faut chercher l'explication dans une auto-infection qui est particulièrement active dans la plasmodiose sciurine.

Le Dr Wenyon, protozoologiste à l'École de médecine tropicale de Londres, qui a examiné plusieurs fois le sang de mes écureuils, durant son séjour à l'Institut Pasteur, a découvert

dans une préparation, colorée d'une façon réussie au Giemsa, qu'il a bien voulu nous donner, une sorte de bâillet que nous représentons très exactement, d'après un dessin fait à la chambre claire : on distingue 7 éléments fusiformes (les 2 de droite se recouvrent partiellement) qui sont colorés en violet foncé, sauf vers le milieu du corps où existe un espace plus clair; l'un des éléments de droite possède en plus une grande vacuole (voir fig A). On croit distinguer à droite du bâillet les restes d'une hématie. La ressemblance avec un bâillet de Coccidie est frappante (on peut supposer 5 autres éléments cachés par les premiers). Nous signalons cette découverte avec les plus expresses réserves quant à l'interprétation; elle est unique; nous n'avons jamais rien vu de semblable dans nos examens d'Annam.

J'ai eu l'occasion d'observer 4 sujets très jeunes de *Sciurus griseimanus* et 2 de *S. vittatus*. Ils avaient été pris au nid. Tous étaient indemnes.

Laplasmadiose sciurine est donc pour les écureuils une maladie chronique. Il y a bien d'autres exemples, sans sortir des plasmadioses, où les parasites ne causent que des troubles inappréciables. Les Oiseaux et les Cheiroptères supportent très bien leurs hématozoaires. Il y a un contraste frappant avec l'aspect de santé de ces animaux et la formule histologique de leur sang.

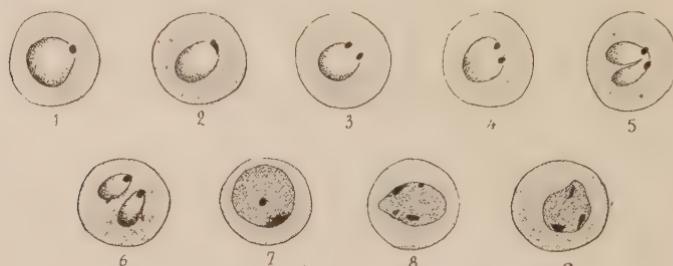


Fig. B. — Grossissement : 2,000 diam. environ.

Les lésions relevées à l'autopsie sont presque insignifiantes. La rate n'est jamais hypertrophiée.

Multiplication de l'hématozoaire. — Je n'ai observé jusqu'ici que la multiplication schizogonique.

Elle a lieu par division amitotique. Chez un écureuil, *Sciurus griseimanus*, largement contaminé, les hémocystozoaires se sont

montrés avec une grande abondance. La schizogonie s'est poursuivie deux jours consécutifs. Les figures de division se répétaient si fréquemment et avec une telle netteté qu'il a été facile de se rendre compte des transformations successives.

Tout d'abord le noyau, qui est en général compact et globuleux, s'étire et s'allonge suivant le contour extérieur du parasite (fig. B-1). L'ectoplasme ne manifeste d'abord aucun changement et la forme générale annulaire est conservée. Plus tard, la masse nucléaire se sépare transversalement et l'on distingue deux karyosomes (fig. B-3). Il se manifeste alors dans l'ectoplasme une activité particulière qui aboutit à la production d'une cloison (fig. B-4), partageant en deux portions à peu près égales le parasite. La séparation commence par le pôle opposé au noyau (fig. B-5). Les karyosomes n' s'éloignent pas beaucoup l'un de l'autre ; ils se regardent de près et se font face. On a en définitive (fig. B-6) deux parasites nouveaux qui vont évoluer chacun d'une manière indépendante.

Il faut remarquer que, pendant toute la période de reproduction asexuée, les écureuils ne manifestent aucun symptôme extraordinaire et conservent leur température normale.

Il existe aussi une amitose qui donne lieu dans le même globule rouge à la formation de 3 et 4 schizontes nouveaux. Peut-être les figures 7,8,9, y conduisent-elles ? Mais la division par 2 est de beaucoup la plus commune.

Hôte intermédiaire. — Les recherches entreprises pour la découverte de la sporogonie n'ont pas abouti. Nous avons d'abord examiné les ectoparasites des écureuils. En captivité, les plus habituels sont des poux, des puces et des tiques du genre *Rhipicephalus*. Mais il peut très bien se faire que les parasites soient différents en liberté.

Nous avons ensuite expérimenté avec les insectes suceurs de sang que l'on prend le plus souvent dans les milieux où vivent les écureuils. Ce furent des *Anopheline* (*Myzomyia rossii*, *Myzorhynchus barbirostris*), un grand nombre de *Culicinæ*, des *Tabanidæ* (*Hæmatopota ciliipes*, *H. meteorica*, *Chrysops dispar*, etc.,) des *Hippoboscidae* (*Hippobosca equina*). Nous ne sommes pas arrivé jusqu'ici à un résultat satisfaisant.

Essais de transmission par inoculations. — Gerhardt a montré, en 1880, qu'on donne la fièvre à un homme sain en lui inocu-

lant du sang d'un paludéen. Les expériences de Gerhardt ont été complétées depuis par celles de Mariotti et Ciarrochi, de Marchiafava et Celli. On transmet l'infection aussi bien par voie sous-cutanée que par voie intraveineuse.

Nous avons institué diverses séries d'expériences pour porter la maladie.

1^o de l'écureuil à l'homme;

2^o de l'homme à l'écureuil;

3^o de l'écureuil à l'écureuil;

4^o d'écureuil à d'autres Rongeurs et à d'autres animaux.

Disons tout de suite que les résultats ont été négatifs. Toutefois, il ne nous paraît pas inutile d'entrer dans quelques détails.

Au début de nos recherches, la parenté des hématozoaires endoglobulaires de l'écureuil avec les formes analogues de l'homme nous avait paru suffisante pour tenter une inoculation à l'homme. Le détail en a été rapporté dans notre premier mémoire (*l. c.*, p. 228).

Suivant les indications de M. Laveran, nous avons essayé de contaminer des *Sciurus* avec l'hématozoaire humain. Nous avons choisi 2 sujets annamites qui étaient atteints. L'un de fièvre tierce bénigne, l'autre de tropicale maligne. Le sang du premier, retiré de la rate, a été inoculé, à la dose de 0 c. c. 25 sous la peau d'un *Sciurus griseimanus* et d'un *S. vittatus* qui ont été suivis pendant 3 mois et 4 mois. Le sang veineux du second malade a été inoculé, à la dose de 0 c. c. 50 sous la peau de 2 *S. griseimanus* qui ont été suivis l'un pendant 4 mois, l'autre pendant 21 jours.

Les résultats négatifs de ces expériences doivent plaider en faveur de l'individualité des plasmodes de l'écureuil et de leur innocuité vis-à-vis de l'organisme humain.

Déjà nous avions établi que les *Macacus rhesus*, les lapins, les cobayes, les pigeons ne pouvaient pas être infectés; nous avons reconnu depuis qu'il en est de même des rats, des souris, d'un insectivore du genre *Tupaia*.

A l'Institut Pasteur de Paris, le Dr Mathis a tenté vainement d'infecter des *Sciurus vulgaris* par inoculations intraveineuse et sous-cutanée de sang de *Sciurus griseimanus*.

Dans le laboratoire, aussi bien en Extrême-Orient qu'en

France, je n'ai jamais observé de cas de contagion naturelle d'écureuil à écureuil. A Nha-Trang, j'en ai abandonné un certain nombre aux piqûres accidentelles des insectes et des parasites qui se trouvent naturellement dans les parcs et écuries. Ceux qui avaient été reconnus indemnes le sont toujours restés.

On ne pourra réellement savoir s'il y a, chez ces derniers animaux, une immunité quelconque que lorsqu'on saura reproduire artificiellement la plasmodiose sciurine. Toujours est-il qu'*in vitro* le sérum d'un animal indemne est inactif vis-à-vis de la plasmodie.

Études sur les cellules pigmentaires des vertébrés

PAR E. GOLOVINE

(avec la pl. XXI)

Dans sa première étude biologique sur la vieillesse, consacrée au mécanisme du blanchiment des cheveux et des poils, M. le professeur Metchnikoff a démontré que ce processus, comme beaucoup d'autres d'atrophie sénile, est provoqué par la phagocytose¹.

D'après les observations de l'auteur, quelques-uns des éléments de la couche médullaire des poils et des cheveux, au début de leur décoloration, commencent à s'immobiliser et à passer dans la couche corticale, alors que les autres, prenant une forme arrondie, s'insinuent dans les cellules avoisinantes qui ont conservé leur forme fusiforme primitive.

Simultanément, dans les parties périphériques de ces poils en voie de décoloration, apparaissent de nombreuses cellules pigmentées de forme extrêmement variées : rondes, ovales, allongées et souvent même ramifiées, présentant alors des éléments d'un aspect parfois tout à fait bizarre.

L'auteur a remarqué que, avec l'apparition de ces cellules ramifiées, coïncide la disparition de grains de pigment dans le reste du poil. Enfin l'auteur a rencontré aussi des amas de ces cellules pigmentées dans le bulbe des poils décolorés et même dans les tissus conjonctifs environnants.

Toutes ces données ont amené M. Metchnikoff à conclure que, dans de certaines conditions, qui ne sont pas du tout définies encore, peut-être sous l'influence de certaines substances toxiques, une partie des cellules pigmentaires se met en mouvement, commence à dévorer les grains de pigment des cellules voisines et à les transporter en dehors des poils en se transforment ainsi en éléments cellulaires qui présentent une forme tout à fait nouvelle de phagocytose : ce sont, selon l'auteur, de véritables pigmentophages, car ils ont acquis la propriété de dévorer exclusivement les grains de pigment sans altérer toutes les autres parties des cellules pigmentaires.

1. METCHNIKOFF (E.), Études biologiques sur la vieillesse. I. Sur le blanchiment des cheveux et des poils, *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1901.

Selon tout apparence, cette propriété de transformation en pigmentophages n'est pas seulement propre aux cellules de la couche médullaire, mais aussi aux éléments de la couche corticale. Bien que la transformation de ces derniers n'ait pas été constatée par M. Metchnikoff, il la considère cependant comme possible, car on observe également le blanchiment dans les poils privés de couche médullaire.

Ces données de l'auteur, tout à fait nouvelles et inattendues, incitent à l'étude de toute une série de questions intimement liées à la fonction des cellules pigmentaires chez divers animaux. Et, naturellement, il était tout d'abord intéressant d'étudier l'action des diverses toxines sur les cellules pigmentaires des différents vertébrés.

Grâce à l'obligeance de M. le professeur Metchnikoff, nous avons pu entreprendre l'étude de cette question, pendant l'été de 1904, dans son laboratoire à l'Institut Pasteur. Nous y avons étudié l'influence des toxines sur les cellules pigmentaires des amphibiens et des reptiles. Ensuite nous avons poursuivi ces observations dans notre laboratoire de Kazan sur des poissons et des mammifères.

Au cours de ces recherches, nous avons été obligés de nous occuper ainsi de certaines questions sur la structure des cellules pigmentaires et sur leurs rapports avec les différents tissus.

Dans l'article actuel, qui présente la première partie de notre travail, nous nous bornerons seulement à y exposer les résultats obtenus pendant l'étude des cellules pigmentaires des poissons, des amphibiens et des reptiles, notamment d'un seul groupe de ces cellules, les mélanophores. Ce sont justement ces cellules, et elles seules, que M. Metchnikoff a constamment en vue quand il parle des grains de pigment et des cellules pigmentaires.

I

MÉLANOPHORES DES POISSONS, DES AMPHIBIES ET DES REPTILES.

1. — *Structure des mélanophores.*

On sait que les mélanophores des vertébrés inférieurs sont munis de nombreuses expansions et ont, en général, une forme

étoilée. Bien que leur structure ait été étudiée plus d'une fois, reste à résoudre néanmoins l'importante question suivante : les mélanophores sont-ils capables ou non de changer leur forme extérieure ; leur forme étoilée est-elle fixe, ou peuvent-ils, comme les amibes, étendre et rentrer leurs expansions ?

Les premières recherches faites sur ces éléments ont répondu affirmativement à la question. On a comparé les mouvements des mélanophores à ceux des amibes. Mais après les observations de Brücke¹ sur le changement de la couleur des caméléons, cette opinion a été presque abandonnée. La majorité des auteurs : Virchow², Harless³, Lister⁴ et autres partageaient l'opinion de Brücke en ce sens que les mélanophores ne changent pas leur forme extérieure, ne rentrent pas leurs expansions et ne font que manifester le mouvement des grains de pigment dans l'intérieur des cellules.

En conséquence de divers facteurs, le pigment tantôt s'accumule au centre de la cellule en forme de boule, tantôt s'étend en elle et en ses expansions. Néanmoins plusieurs auteurs, comme Axmann⁵, par exemple, continuaient à soutenir l'opinion ancienne, qui fut surtout défendue par Leydig, dans ses travaux de 1853, 1876 et 1889⁶.

Parmi les nouveaux auteurs, les uns, comme Biedermann⁷, à qui nous devons les recherches les plus approfondies sur la fonction des cellules pigmentaires, laissent cette question ouverte, tandis que les autres, comme Ballovitz⁸, continuent à défendre énergiquement la vieille opinion de Brücke. Ainsi la question doit être considérée comme à résoudre.

1. BRÜCKE (E.), Untersuchungen über den Farbenwechsel des africanischen Chamäleons, *Deutschr. d. k. Ak. d. Wissenschaften zu Wien. Math.-natur. Kl.*, Bd. IV, 1852.

2. VIRCHOW (R.), Chromatophoren beim Frosch, *Virchow's Arch. f. pathol. Anat.* Bd. VI, 1854.

3. HARLESS (E.), Über die Chromatophoren des Frosches. *Zeitchr. f. Wissen. Zool.* Bd. V, 1854.

4. LISTER (J.), On the cutaneous pigmentary system of the frog, (commun. by Dr. Sharpey), *Philosoph. Transaction of the royal. Soc. of. London.* Vol. 148. For the year, 1858. London, 1859.

5. AXMANN, Beiträge zur mikroskopischen Anatomie und Physiologie des Gangliennervensystems, 1853.

6. LEYDIG (F.), Anat.-histolog. Untersuchungen über Fischen und Reptilien, Berlin, 1853. — Über die allgemeine Bedeckungen der Amphibien. *Arch. f. mikr. Anat.* Bd. XII, 1876. — Pigmente der Hautdecke und der Iris, *Verch. d. physik. med. Ges. g. Würzburg*, Bd. XXII, 1889.

7. BIEDERMANN (W.), Über den Farbenwechsel der Frösche, *Pflüger's Archiv.*, Bd. V, 1892.

8. BALLOWITZ (E.), Die Nervendigungen der Pigmentenzellen. Ein Beitrag zur Kenntiss des Zusammehanges, etc., *Zeitschr. für Wissensch. Zool.*, Bd. LVI, 1893.

En mettant en regard toutes les objections dirigées contre les observations qui démontrent la faculté des mélanophores de se contracter, il est facile de se convaincre que, sauf les considérations théoriques dont nous parlerons plus bas, toutes les objections sont fondées sur les données suivantes : 1^o chez les mélanophores qui ont ramassé leur pigment au centre, on voit des expansions libres de grains de pigment ; 2^o l'étude de ces expansions présente une difficulté très grande à cause de leur transparence, car elles peuvent alors facilement échapper à l'observation.

En effet, si l'on étudie les cellules pigmentaires à l'état vivant, ou à l'aide des méthodes qui ont servi aux auteurs cités ci-dessus, il est presque impossible de distinguer le protoplasma de leurs expansions de celui des tissus avoisinants, même quand ils contiennent de petites quantités de grains de pigment. Le plasma des expansions est tellement transparent et finement granulé, que les grains de mélanine qui s'y trouvent paraissent être en dehors de la cellule pigmentaire.

Cependant les méthodes de coloration de la technique microscopique actuelle, nous donnent le moyen de faire ressortir, avec la netteté voulue, n'importe quelle partie de cytoplasma et de résoudre ainsi cette question sans grande difficulté.

Dans ce but nous avons étudié les mélanophores de la perche, du brochet, de la truite, du gardon ; des *Hyla arborea*, *Rana esculenta*, *Rana temporaria* ; du *Triton cristatus* ; du *Cameleo vulgaris*.

Dans ces recherches, nous nous sommes servi des préparations de fragments de peau et des coupes transversales. Les premières sont surtout favorables à l'étude des mélanophores des poissons, tandis que les secondes conviennent à l'étude des mélanophores des grenouilles, des tritons et des caméléons. Pour la *Hyla arborea*, les deux méthodes sont également bonnes.

Pour faire ressortir les expansions protoplasmiques des mélanophores, ce sont les colorations combinées ainsi que les colorations suivies de lavage qui nous ont donné les meilleurs résultats. L'essai de nombreux procédés nous a toujours donné le même résultat : quand les mélanophores ont une forme étoilée, le protoplasma des expansions, dans les parties

dénues de pigment, ressort très nettement. Dans les cas où le pigment des mélanophores se ramasse en boule et que la cellule à l'état vivant prend une forme arrondie, les mêmes méthodes de coloration démontrent parfaitement bien qu'il n'y a pas une seule expansion libre de pigment autour des mélanophores.

Par conséquent, à l'excitation, non seulement les grains de pigment s'accumulent au centre de la cellule, mais encore toute la cellule se contracte en faisant rentrer ses expansions absolument comme le font les amibes avec leurs pseudopodes.

Sous ce rapport, ce sont les coupes transversales de la peau du caméléon qui sont surtout convaincantes. Les mélanophores de ce dernier présentent, comme on le sait, non une forme étoilée aplatie, mais une forme en buisson, parce que le corps de la cellule git profondément dans le corium, toutes les expansions se dirigent exclusivement vers la périphérie. Quand les expansions sont étendues, alors, comme on le voit sur la figure 3, Pl. XXI, ils se rapprochent vers l'épiderme, à travers des fissures intercellulaires spéciales. Dans ce cas, étant donnée une coloration appropriée, leur protoplasma, même dans les parties pauvres en grains de pigment, peut s'observer très nettement. Si nous provoquons une contraction des mélanophores et si, immédiatement après, nous traitons par un fixage rapide la partie correspondante de la peau, on peut voir alors sur les coupes que les mêmes espaces intercellulaires ne contiennent aucune trace de protoplasma (fig. 5).

L'examen des mélanophores à l'état vivant, chez des animaux comme les caméléons, *Rana esculenta*, *Rana temporaria*, *Triton cristatus*, etc., est extrêmement difficile à cause de l'épaisseur de leur peau. Mais, par contre, ils sont faciles à observer chez la *Hyla arborea*, dans les parties de la peau où se termine la région d'extension de ces cellules, par exemple dans les parties latérales du tronc et des extrémités postérieures; de même chez les poissons, dans les fragments de la peau prise dans la région frontale ou operculaire. A ce genre d'observation, conviennent également très bien les embryons de certains poissons, par exemple la perche, le brochet ou la truite. Chez les embryons du brochet, 3 ou 4 jours après leur éclosion, toute la surface de la vésicule vitéline est recouverte

de gros mélanophores. En mettant un pareil embryon dans un tube en verre de diamètre approprié et y laissant passer de l'eau, on peut alors observer, pendant des heures entières, les mouvements des mélanophores. Dans ces conditions, on les voit très distinctement faisant les uns rentrer, les autres sortir leurs expansions, et en même temps s'étendre eux-mêmes dans diverses directions et changer ainsi constamment leur forme extérieure. Pendant ces mouvements, souvent leurs expansions se soudent entre elles ; d'un autre côté, se soudent aussi entre elles les expansions des cellules voisines, formant ainsi un syncytium de 2, 3 et même 4 cellules (fig. 2, 4, 6). Dans certains cas, cette liaison est si intime que les cellules soudées, peuvent être prises, à première vue, pour un mélanophore géant.

Dans les mêmes conditions d'observation, on peut voir que les expansions d'un mélanophore complètement dilaté sont relativement très courtes et que le pigment s'étale très régulièrement dans le corps de la cellule. En fixant le mélanophore dans cet état et en le colorant, il est facile de se convaincre que le corps de la cellule est formé d'un protoplasma continu. Ballovitz a observé des orifices dans le corps des mélanophores. Vu le grand intérêt que présente cette observation, nous avons étudié, de notre côté, une grande quantité de mélanophores à cet état d'extension, mais nous n'avons jamais pu observer de perforation. Il est vrai qu'on peut souvent remarquer, comme on le voit sur la figure 2, des orifices (o) dans le corps des mélanophores très ramifiés, mais ces orifices n'ont naturellement aucun rapport avec leur structure.

En suivant la formation des pseudopodes des mélanophores, il est facile de se convaincre que la contraction et la dilatation du protoplasma se produit constamment dans toutes ses parties. Simultanément, se produisent la rétraction et l'expansion du pigment. Ainsi, par exemple, dans un pseudopode très dilaté et, par conséquent, devenu presque transparent, son extrémité seule peut se contracter, et alors il prend une forme arrondie en devenant complètement noir. En même temps la partie médiane de l'expansion peut se dilater à un tel point que son extrémité paraît être séparée du corps de la cellule. Dans d'autres cas, c'est seulement la partie médiane de l'expansion qui com-

mence à se contracter, ou rien que les parties périphériques.

On voit souvent les expansions rester à demi translucides et c'est alors le corps seul de la cellule qui se contracte, en prenant dans ce cas une coloration tout à fait noire; ou bien ce n'est qu'une partie de la cellule qui se contracte en faisant simultanément rentrer aussi ses expansions, etc. Ces variations peuvent aller à l'infini.

Cependant, durant tous ces changements nous n'avons jamais pu observer le mouvement des grains de pigment dans les parties intérieures de cytoplasma, mouvement mentionné par Brücke et d'autres auteurs. Du reste, aucun d'eux n'a donné de description détaillée de ce phénomène, et il est bien probable que ce sont les divers déplacements de ce pigment, déterminés dans les mélanophores par les contractions variées indiquées plus haut des différentes parties de leur cytoplasma, qu'on a pris pour le mouvement du pigment.

2. — *Rapport des mélanophores au système nerveux.*

C'est à Leydig¹ que nous devons la première tentative de détermination des relations anatomiques entre les mélanophores et le système nerveux, dont l'existence paraissait être établie indiscutablement par les observations physiologiques de Brücke, v. Wittich, Virchow, Lotar Meyer, Lister, Pouchet, P. Bert, Krukenberg, Leydig et d'autres, et récemment par Biedermann. Sur les fragments de peau fortement macérée de *Lacerta agilis*, Leydig a réussi à dégager la couche pigmentaire sous la forme de fine pellicule et à y observer « un magnifique réseau nerveux formant des mailles polygonales ». Des points d'intersection de ce réseau partaient des fibres nerveuses, dont une partie se dirigeait vers la périphérie tandis que l'autre s'unissait aux mélanophores. Ce même passage immédiat des fibres nerveuses dans le plasma des cellules pigmentaires a été aussi observé par Leydig chez les serpents.

1. LEYDIG F., Die in Deutsch-land lebenden Arten der Saurien, Tübingen, 1872. — Über die allgemeinen Bedeckungen der Amphibien, *Arch. f. Micr. Anat.* Bd. XII, 1876. — Über die äusseren Bedeckungen der Reptilien u. Amphibien Neue Beiträge, *Arch. f. Micr. Anat.* Bd. IX, 1873.

Ehrmann¹, puis Lode², employant une méthode d'investigation plus perfectionnée, à savoir la méthode au sel d'or, essayaient, de leur côté, de prouver que ce même passage immédiat de la substance des fibres nerveuses au plasma de la cellule pigmentaire a lieu aussi chez les grenouilles et les poissons. Lode a même vu la pigmentation dans les terminaisons des fibres nerveuses, ce qui, d'après son opinion, apparaît comme « une preuve certaine de la transition graduelle de la substance contractile dans la fibre nerveuse ».

Enfin, de nos jours, Ballowitz, en traitant des fragments de la peau de divers poissons — brochet, perche, hareng, dorsch, anguille, gardon, etc., par la méthode de Golgi, modifiée par Ramon y Cajal a vu également l'innervation des mélanophores. Cette méthode a permis à l'auteur d'observer comment, vers chaque mélanophore, s'approchent une, plusieurs ou parfois même un très grand nombre de fibres nerveuses, tantôt fines, tantôt assez grosses. Aux environs de la cellule pigmentaire, chacune de ces branches se bifurque en une immense quantité de minces fibrilles qui, avec une imprégnation bien réussie, forme un tel « écheveau » que, d'après l'auteur lui-même, on ne peut rien y distinguer. Sur les préparations insuffisamment colorées, et par suite plus distinctes, l'auteur a remarqué comment une partie de ces fibrilles s'approchent du mélanophore et se ramifient en des filaments variqueux aussi bien sur sa surface supérieure que sur l'inférieure. Mais la majorité des fibres nerveuses se dirige vers la périphérie et forme, là aussi, un réseau dont les terminaisons nerveuses ou bien atteignent les papilles cutanées, ou se terminent entre les éléments épithéliaux. Là où les mélanophores sont rapprochés les uns des autres, comme, par exemple, dans la peau des régions buccales de la perche, les fibres nerveuses se dirigent vers l'épiderme, partant directement de la masse des fibrilles nerveuses qui entourent la cellule pigmentaire.

Ainsi, d'après les observations de Ballowitz, il se forme autour du mélanophore, pour ainsi dire, deux plaques de terminaisons nerveuses. Cependant ces plaques ne sont pas séparées

1. EHRMANN (S.), Über die Nervendigungen in den Pigmentzellen der Froschhaut. *Sitz. d. Akad. d. Wissenschaft. zu Wien. M. = N. Kl.*, Bd 84, III Abt. 1881.

2. LODÉ (A.), Beiträge zur Anat. und Physiol. des Farbenwechsels der Fische, *Sitz. d. Akad. d. Wiss. zu Wien.* Bd. LXXXIX, 1890.

l'une de l'autre, elles sont unies par des ramifications multiples perforant le corps du mélanophore. Si, sans colorer les nerfs, on fixe simplement les mélanophores par la liqueur de Flemming, alors, même sur de pareilles préparations, on peut voir, dans le corps des mélanophores, de petits orifices nettement découpés. Il y en a parfois plusieurs dans une même cellule.

« Il n'y a pas de doute, dit l'auteur, que ces orifices soient causés par le passage des nerfs. »

En se basant sur ces données, l'auteur conclut que les mélanophores sont probablement innervés par des fibres spéciales, *fibres motrices*, selon lui, qui s'approchent des mélanophores avec les nerfs sensitifs de la peau.

Les recherches de Ballowitz, si différentes de tout ce qui avait été découvert dans ce sens par les auteurs précédents, qui, comme le remarque très justement Ballowitz, n'ont même pas vu de terminaisons nerveuses autour des mélanophores, — ces recherches ont été confirmées ensuite par Ebert et Bunge¹. Les résultats obtenus presque en même temps par ces derniers étaient, en somme, analogues. Ces auteurs se sont servi également de la méthode d'imprégnation et ont aussi remarqué que, sur la surface des mélanophores, les terminaisons nerveuses se répandent sous forme de filaments variqueux, mais ils n'ont jamais vu les fibres nerveuses traverser le corps du mélanophore. De plus, ces auteurs ont trouvé que, outre les filaments variqueux distribués sur la surface des mélanophores, des mêmes ramifications part toute une série de filaments variqueux pareils, se disposant entre les mélanophores et n'ayant avec ces derniers aucun rapport.

Vu l'extrême importance des observations de Ballowitz et de Eberth et Bunge, dans toute une série de questions ayant trait à celle de l'innervation des mélanophores, nous nous sommes efforcés de vérifier avec le plus grand soin les observations de ces auteurs.

Pour éliminer les terminaisons nerveuses, nous nous sommes servis : 1^o de la méthode au sel d'or et de celle de Ranvier (au jus de citron); 2^o des méthodes d'imprégnation qui ont été

1. EBERT und BUNGE, Die Nerven der chromatophoren, *Arch. f. Microsc. Anat.*, t. XXXVI, S. 370, 1895.

employées par les auteurs mentionnés ci-dessus; 3^e de la coloration vitale au bleu de méthylène.

C'est cette dernière méthode qui nous a donné les meilleurs résultats, tant au point de vue de la totalité de la coloration des terminaisons nerveuses que de la clarté de l'image. Mais nous avons aussi beaucoup employé les deux autres procédés pour obtenir, en vue du contrôle et de la comparaison, les mêmes images qui avaient été obtenues par les auteurs précédents.

Parmi les poissons que nous avons examinés, c'est la perche qui s'est trouvée la plus appropriée à cette étude, surtout pour les colorations vitales au bleu de méthylène. Comme jusqu'à présent cette coloration n'avait pas encore été appliquée à l'élimination des terminaisons nerveuses des mélanoophores, nous croyons utile de donner ici quelques indications techniques sur l'application de cette méthode.

Après de nombreuses expériences, nous avons trouvé qu'on peut obtenir une coloration complète des nerfs de la peau en employant des injections sous-cutanées. Ni les injections des vaisseaux, ni la coloration des fragments de la peau par les solutions faibles de bleu de méthylène ne nous ont donné de résultats satisfaisants.

Pour les injections sous-cutanées, il est préférable de prendre la peau de l'appareil operculaire. Pour obtenir une bonne coloration, il est indispensable d'injecter exactement la quantité nécessaire de colorant. Comme cette quantité varie avec chaque objet, nous avons, comme règle générale, suivi la marche que voici : nous nous servons toujours d'une solution saturée de bleu de méthylène dans l'eau distillée et nous injectons le colorant en introduisant l'aiguille (N° 16-18) de la seringue dans la partie inférieure de la joue de la perche (en la dirigeant vers le côté dorsal), évitant l'apparition du colorant dans la région inférieure de l'œil et que ce dernier ne fasse saillie bien distinctement. On met ensuite le poisson injecté dans l'aquarium à eau courante (8°-10°) et on l'y garde pendant 1 h. 40 — 2 heures.

Si l'on introduit une quantité de colorant moindre à celle indiquée plus haut, ou qu'on tienne dans l'aquarium la perche injectée un laps de temps plus court, ce ne sont alors que les

gros rameaux qui se coloreront, et, autour des mélanophores, les nerfs ou ne se coloreront pas du tout, ou seuls les épaississements variqueux se teinteront. En introduisant sous la peau une quantité de colorant plus grande que celle indiquée ci-dessus, ce sont alors les tissus environnants qui se colorent presque en même temps que les nerfs. Enfin si l'on augmente le temps de coloration, une partie des nerfs commence à se décolorer.

Pour les autres poissons, les conditions de coloration sont autres. Ainsi, avec le brochet par exemple, il faut moins de temps pour obtenir la coloration de ses terminaisons nerveuses. Avec ce poisson nous avons aussi obtenu plusieurs fois une coloration complète des nerfs en introduisant le bleu de méthylène sous la peau de la région frontale ; mais malheureusement, faute de quantité suffisante de matériel, nous n'avons pu élucider les conditions de coloration complète avec la même exactitude qu'avec la perche. Il est indispensable enfin d'ajouter qu'à une température plus élevée, la coloration devient très irrégulière. Ainsi, à la température de 15°—18°, nous ne sommes déjà plus arrivés à éliminer entièrement les réseaux nerveux.

On peut fixer la coloration au bleu de méthylène ou par le picrate d'ammoniaque, selon le procédé de M. Smirnoff¹ et monter la préparation à la glycérine, ou la fixer par le sublimé, avec le molybdate d'ammoniaque comme nous l'avons indiqué pour les cellules phagocytaires des nématodes². Comme, dans le cas donné, on est obligé d'étudier exclusivement des fragments de la peau et non pas les coupes, c'est le premier procédé de fixage qui est préférable, comme étant le plus simple et le plus rapide. De plus, les préparations à la glycérine sont beaucoup plus transparentes que celle au baume de Canada, et en même temps elles sont plus commodes, en ce sens qu'on peut les tourner et les examiner des deux côtés, ce qui est très important dans beaucoup de cas.

En traitant la peau par la méthode de Ramon y Cajal, nous n'avons jamais pu obtenir une coloration aussi complète des réseaux nerveux qu'en employant le bleu de méthylène. En

1. SMIRNOFF (A.), *Matériaux pour l'histologie du système périphérique des batraciens*, Kazan, 1891 (en russe).

2. GOLOVINE (E.), *Recherches sur les nématodes*, I. *Organes phagocytaires*, Kazan, 1901 (en russe).

outre, les préparations obtenues par cette méthode sont très grossières. Il est intéressant à noter qu'en l'employant ce sont tout d'abord les épaissements variqueux qui s'éliminent et ensuite seulement les parties des fibrilles nerveuses qui les unissent. Il arrive très souvent alors que les varicosités seules se colorent. On voit souvent aussi s'éliminer rien que des parties de fibrille.

Nous avons également essayé la méthode au sel d'or, non seulement sur les poissons, mais encore sur le *Hyla arborea* et sur les caméléons, elle ne nous a pas donné de résultats satisfaisants : les fines ramifications ne se dégageaient presque pas.

Bien que les préparations au bleu de méthylène, contrairement à ce qui s'obtient avec l'imprégnation, donnent des images parfaitement nettes et distinctes, néanmoins, vu la grande quantité des fibrilles nerveuses entourant les mélanophores, leur étude présente un travail assez compliqué et minutieux. Nous avons examiné une assez grande quantité de semblables préparations et nos recherches relatives à la partie la plus essentielle de la question, c'est-à-dire celle de la distribution des terminaisons nerveuses sur les mélanophores, nous ont conduit à des conclusions tout à fait opposées à celles de Ballowitz et de Eberth et Bunge. Sur les préparations à coloration complète, nous n'avons jamais pu remarquer que les terminaisons nerveuses se répandissent sur les mélanophores. Nous n'avons également jamais vu leur cytoplasma perforé par les fibrilles nerveuses.

Comme nous le démontre la figure 1 sur laquelle nous avons représenté toutes les fibres nerveuses entourant le mélanophore donné, aucune d'elle ne se termine ni sur le mélanophore lui-même, ni près de lui. Si nous suivons la marche d'une de ces fibrilles, on peut presque toujours se convaincre qu'elle se dirige vers la périphérie et se termine dans l'épiderme, comme l'ont indiqué fort exactement Ballowitz et Eberth et Bunge pour la plupart des fibrilles entourant les mélanophores.

La coloration étant incomplète, ce ne sont que des régions séparées de la fibrille qui se colorent et tout d'abord leur varicosité. C'est pourquoi la fibrille incomplètement colorée s'arrête toujours à l'épaississement variqueux.

Le même phénomène se remarque dans les préparations faites par la méthode de Golgi. Là aussi ce sont les épaississements variqueux qui s'éliminent les premiers, puis les parties qui les unissent. En appliquant cette dernière méthode, nous n'avons jamais pu éliminer les fibrilles nerveuses aussi nettement qu'avec le bleu de méthylène, et nous n'avons jamais pu dégager le réseau des filaments variqueux par la méthode au sel d'or.

C'est dans cette propriété des épaississements variqueux de se colorer avant les autres parties des fibres nerveuses que réside, à notre avis, la cause des dissemblances entre nos résultats et ceux de Ballowitz et de Eberth et Bunge.

Il est tout à fait évident que les terminaisons nerveuses que ces auteurs ont vues et dessinées d'après les préparations insuffisamment colorées ne présentent que des fibrilles variqueuses insuffisamment teintées. Les appareils terminaux qu'ils ont présentés dans leurs figures sont des épaississements variqueux en partie déformés par le précipité d'argent. Eberth et Bunge ont avec raison considéré comme suspectes ces terminaisons nerveuses, et fort justement les ont indiquées dans leurs figures avec un point d'interrogation (*loc. c.*, fig. 4, t. XVIII).

Il n'y a pas le moindre doute que toutes les fibrilles nerveuses éliminées auprès des mélanophores par Ballowitz (Eberth), et Bunge, et nous, à l'aide de différentes méthodes, présentent les mêmes nerfs sensitifs cutanés que les nerfs qui se trouvent entre les cellules pigmentaires. De cette façon, les mélanophores n'ont aucun lien anatomique avec les terminaisons nerveuses, et par conséquent sont des formations tout à fait indépendantes du système nerveux.

Cependant le système nerveux, comme le démontrent sans le moindre doute, les observations physiologiques, influe sur les mélanophores. Nous verrons plus loin qu'on peut donner à ce phénomène une explication tout à fait différente de celle des auteurs précédents.

3. — *Action des toxines sur les mélanophores.*

Dans la série des expériences que nous allons exposer, relativement à l'action des toxines sur les mélanophores, nous nous sommes servi exclusivement de celles qui proviennent de

cultures bactériennes pures. Nous avons eu principalement en vue d'éclaircir leur action directe et immédiate sur les cellules pigmentaires. C'est pourquoi, dans cette série, ne sont groupées que les expériences dans lesquelles nous nous sommes servi des toxines non diluées, filtrées ou non et que nous avons introduites exclusivement sous la peau.

Toxine diphtérique. — Lorsqu'on introduit sous la peau d'un caméléon gris foncé 1/2 c. c. de toxine diphtérique filtrée, quelques secondes après, la partie de la peau qui couvre la pustule formée commence peu à peu à s'éclaircir et, une minute après, la tache formée autour de la piqûre prend la coloration blanc jaunâtre que la peau de l'animal revêt après la mort. La partie de la peau devenue blanche est nettement délimitée par la surface de la pustule. Pendant les premières 8-10 heures, elle n'éprouve aucune modification. Environ 17 heures après, la pustule s'agrandit un peu à cause de la résorption de toxine ; la peau qui la recouvre continue à conserver sa coloration blanche. 23 heures plus tard, la tache devient plus foncée et à l'aide d'une forte loupe on peut voir apparaître des points noirs, dans les tubercules isolés de la peau. Pendant les heures suivantes, le nombre de ces tubercules augmente, les points noirs commencent à apparaître aussi entre eux. Environ deux jours après le commencement de l'expérience, la partie injectée de la peau reprend la coloration normale. L'expérience avec les toxines diphtériques fut faite sur 3 sujets en présence d'un quatrième de contrôle. A ce dernier, ainsi qu'à l'un de ceux injectés par la toxine, nous avons introduit sous la peau, du côté opposé, 1/2 c. c. de bouillon pur. Une minute plus tard on pouvait remarquer chez ces deux animaux un faible blanchiment de quelques tubercules isolés autour de la piqûre. Au bout de dix minutes, plusieurs des tubercules commencèrent à foncer, et, 1 h. 20 après, la partie de la peau injectée avait repris sa coloration antérieure.

Si l'on expose un caméléon inoculé par la toxine diphtérique à la lumière directe, après que la tache formée autour de la piqûre est nettement ressortie, alors sa peau, comme celle du caméléon de contrôle commence à blanchir 1 h.-1 1/2 après. et la tache disparaît. Portés ensuite à l'ombre, les 2 caméléons

deviennent, peu après, de nouveau foncés et chez l'exemplaire injecté la tache réapparaît.

Si on renouvelle la même expérience quand la tache produite par la toxine diptérique a disparu, durant les quelques premières heures la partie injectée de la peau réagit très lentement et n'atteint jamais un blanchiment complet. Beaucoup de tubercules sur sa surface restent foncés, et chez les caméléons blanchis, ils apparaissent sous forme de tache grise. Le 3^e jour, la partie de la peau injectée se remet complètement et commence à changer de coloration comme le reste de la peau.

Sur les coupes de peau soumises à l'action de la toxine, dans le courant des 3 premières heures, on peut voir que les mélanophores se sont contractés et ont fait rentrer presque toutes leurs expansions: celles qui restent sont devenues beaucoup plus courtes, et aucune d'elles n'envoie ses expansions vers l'épiderme.

En somme, c'est le même tableau que celui que présentent les mélanophores sur les coupes de la peau d'un caméléon mort.

Les coupes de la peau prises dans la partie injectée, 24 heures après l'injection, quand des tubercules séparés ont commencé à y foncer, démontrent que quelques mélanophores sont restés à l'état de contraction, tandis que chez d'autres ont apparu des expansions ramifiées et dans quelques tubercules ces expansions atteignent l'épiderme.

Chez les amphibiens, la toxine diptérique provoque le même effet que sur le caméléon, mais d'une façon moins nette. Son action cependant, se manifeste chez ces animaux aussitôt après l'injection. Si l'on introduit sous la peau de la *Hyla arborea* d'une coloration brune, 1/2 c. c. de cette toxine, on voit, autour de la piqûre, la peau commencer aussitôt à prendre une coloration verte, et dans la plupart de nos expériences, cette coloration devenait d'un vert vif, quelques minutes après.

Plusieurs de ces *Hyla* colorées en vert gardaient ensuite cette coloration pendant très longtemps: les autres prenaient leur coloration ancienne, d'un brun foncé, 40-50 minutes après le commencement de l'expérience. Chez la *Hyla* à la peau verte, la toxine diptérique ne produisait aucun changement dans la couleur, même si l'on introduisait sous la peau des

quantités relativement très grandes de toxine, 1 1/2 à 2 c. c.

Contrairement à ce qui s'observe chez les caméléons, cette toxine ne provoque pas, chez les animaux mentionnés plus haut, cette coloration d'un jaune pâle, que l'on remarque chez eux après la mort, c'est-à-dire que, comme le démontrent aussi les coupes transversales de la peau, cela ne provoque pas, chez les mélanophores, une rétraction complète de leurs expansions, quoique les cellules pigmentaires isolées prennent une forme arrondie.

Chez la *Rana esculenta* et la *Rana temporaria*, la toxine diptérique ne produit pas de changement aussi fort dans la coloration que celui qu'on observe chez les caméléons et la *Hyla*, mais cela s'explique par l'extrême accumulation des mélanophores. Là où ils sont plus rares, par exemple sur la peau des régions latérales, on peut voir très clairement que les mélanophores commencent à rétracter leurs expansions aussitôt après l'injection de la toxine, et quelques-uns d'entre eux, 40 à 50 minutes après, prennent déjà une forme arrondie, bien que la plupart des mélanophores continuent à garder de courtes expansions.

Chez le *Triton cristatus*, même avec des injections nombreuses, cette toxine n'agissait pas d'une façon apparente sur les mélanophores.

Chez la perche et le brochet, la toxine diptérique provoque une contraction presque momentanée des mélanophores (fig. 9), qui, cependant, 24 heures après, prennent leur aspect normal.

La perche supporte très bien les injections répétées de grandes quantités de toxine diptérique. Quelques exemplaires auxquels nous injections journalièrement de cette toxine sous la peau de la joue, par 1/2 c. c. — quantité qui provoque un effet immédiat — ont survécu dans notre aquarium plus de deux mois (du milieu d'octobre presque au milieu de décembre); mais chez ces exemplaires, comme chez ceux que nous primes dans cet intervalle pour les préparations, les mélanophores n'ont manifesté aucun changement, excepté ceux désignés plus haut.

Toxine tétanique. — Nous avons étudié l'action de cette toxine sur des caméléons et des *Hyla*. Pour les injections sous-cutanées nous avons employé aussi bien la toxine filtrée

que la culture et, dans les deux cas, nous avons obtenu des résultats tout à fait analogues. Les mélanophores des caméléons se contractaient presque instantanément après l'introduction de la toxine (1/2 c. c.) et la tache formée avait tout à fait le même aspect qu'avec la toxine diptérique.

Dix minutes après, la tache s'étendait fortement, et, si la piqûre était produite sur l'un des côtés du caméléon, alors, après le délai indiqué, toute la partie correspondante du corps de l'animal prenait une coloration d'un jaune pâle. Après vingt-quatre heures, la tache commençait à disparaître et alors, comme dans les cas précédents, sur le côté blanchi de l'animal, quelques tubercules isolées de la peau se fonçaient; ensuite les autres parties prenaient une coloration foncée. Deux jours après, disparaissaient les dernières traces de la tache et débutait la contracture de la partie injectée. Sur les coupes transversales de la peau, prise dans la tache blanche qui s'était formée, et aussi après qu'elle eût commencé à foncer, les mélanophores apparurent exactement dans le même état qu'après l'injection de la toxine diptérique.

Chez la *Hyla arborea*, la toxine tétanique provoque une contraction relativement faible des mélanophores. Une minute après l'injection à des exemplaires d'un gris foncé de 1/2 c. c. de toxine ou de culture, on peut observer une faible coloration verte, qui disparaît totalement 70 à 80 minutes plus tard. Ce qui est intéressant, c'est qu'après la disparition de la coloration verte, la *Hyla* prenait une coloration encore plus foncée qu'auparavant. Si l'on injecte cette toxine (1/2 c. c.) sous la peau des *Hyla* vertes, dans les premières minutes après l'introduction de la toxine on n'observe aucun effet, mais peu à peu, sur la surface de la pustule, commencent à apparaître des taches d'un brun clair. Deux ou trois heures plus tard, ces taches deviennent brun foncé. Les *Hylas* gardaient cette coloration durant deux journées, puis commençaient à changer de couleur de la même manière que les exemplaires de contrôle.

Vibrio Metchnikovi. — Pour l'injection nous avons employé, dans les expériences suivantes, exclusivement des cultures sur bouillon. Le maximum de l'effet s'obtenait déjà dès l'introduction sous la peau d'un 1/4 c. c. et, par la rapidité de l'action sur les mélanophores, la toxine de cette culture, parmi celles

que nous avons étudiées, se trouva, avec la culture tétanique, être la plus violente. Les caméléons, étant donnée la quantité de culture indiquée plus haut et même avec une quantité moindre, (1/8 c. c.) périsaient dans 24 à 27 heures. Comme dans les expériences indiquées plus haut, dans ce cas également, autour de la place injectée, se formait une tache d'un blanc jaune, qui restait telle durant 18 à 20 heures, puis une partie des tubercules de sa surface commençait à foncer. Après la mort, ces tubercules noircis devenaient de nouveau aussi clairs que le reste de la peau. Sur les coupes transversales de la partie tachée de la peau on pouvait voir que, parmi les mélanophores, quelques-uns seulement avaient gardé leurs expansions, et ceux-là même sont devenus épais et courts en perdant toutes leurs ramifications périphériques.

Chez la *Hyla*, cette culture provoque aussi un effet brusque et immédiat. Déjà, en injectant sous la peau des *Hylas* brunes 3 degrés de la seringue, la peau commence aussitôt à verdir autour de la piqûre. Les *Hyla* se trouvent être encore plus sensibles à cette culture que les caméléons. Elles périsseent en 1 h. 1/2-2 heures, non seulement après l'injection de la quantité indiquée plus haut, mais même à l'introduction sous la peau de 1/4 c. c. de cette culture diluée à 1 : 4 d'eau distillée.

Nous essayâmes aussi cette culture sur des tritons, mais elle ne produisit aucun changement dans la coloration. Nous en avons introduit sous la peau d'un des exemplaires 1 c. c., quotidiennement durant une semaine, mais nous n'avons obtenu aucun effet.

Microbacterium tuberculosis. — Nous n'avons étudié l'effet de la toxine tuberculeuse que sur les mélanophores des caméléons. Pour l'injection nous avons employé le bouillon de culture mélangé de bactéries. Avec 1-1 1/2 c. c. de cette toxine introduite sous la peau, la contraction des mélanophores commence à se manifester quelques minutes après l'injection, et 4-5 minutes plus tard, la tache produite atteint le maximum de blanchiment.

La journée suivante, la tache prend une coloration presque noire et apparaît bien plus foncée que tout le reste de la peau.

Le troisième jour, chez tous les caméléons à l'épreuve, la tache redevint blanche, mais non plus au même degré que dans

les premières heures après l'injection : quelques tubercules de la peau restaient foncés. Les taches gardèrent cette coloration toute la journée suivante, ensuite elles devinrent de nouveau foncées et durant 5 jours conservèrent cette coloration. Un jour après, deux exemplaires périrent et le troisième s'affaiblit tellement que nous résolûmes de le sacrifier pour des préparations.

Un de ces exemplaires, pendant les premières heures après l'injection, se trouvait dans une position verticale et immobile. Pendant tout ce temps la pustule qui s'était produite pendant l'injection descendait lentement vers la queue, et, avec elle, la tache blanche changeait aussi simultanément de place. Cette expérience démontre ainsi d'une façon péremptoire que la toxine de cette culture provoque les contractions des mélanophores en n'agissant guère sur eux qu'en quantité considérable. Dès que son action commence à cesser les mélanophores s'étendent rapidement.

Streptococcus. — La culture de ce microbe nous a été gracieusement fournie par M. le docteur Besredka. Nous avons eu la possibilité d'expérimenter son action sur les mélanophores de la *Hyla arborea* et de la *Rana esculenta*. Chez les premières, colorées en brun, cette culture, après l'introduction sous la peau de 1-1/2 c. c., faisait apparaître dans les premières minutes après l'injection un fin pointillé vert. 20 à 25 minutes après, la peau prenait une teinte d'un gris rosé avec un reflet métallique qui, vingt-quatre heures plus tard, se changeait en une coloration olive foncée. Quand cette culture était injectée à des *Hyla* vertes, tout d'abord la peau prenait également une coloration d'un vert foncé, qui dans vingt-quatre heures se changeait de nouveau en vert vif, mais autour de la piqûre restaient de petites taches d'une couleur cendrée qui disparaissaient les journées suivantes.

Outre les toxines désignées ci-dessus, nous avons également essayé l'action du *Vibrio cholerae Koch* (*Cholera asiatica*), du *Bacillus anthracis*, du *B. coli commune*, du venin de serpent et de l'alcool. La culture de *Cholera asiatica*, même à des doses très grandes, 1 1/2-2 c. c., ne provoquait guère, chez les caméléons et les *Hyla*, qu'une faible contraction des mélanophores, tout à fait la même qu'avec le bouillon pur. Une contraction un

peu plus forte, mais de peu de durée, était causée par le charbon, le *B. coli* et le venin de serpent. L'alcool à 50 0/0 provoqua une réaction tout à fait opposée à celle que donnaient les toxines : introduit sous la peau des caméléons à la quantité de 1/2-1 1/4 c. c., il provoquait la formation, à l'endroit de l'injection, d'une tache foncée, qui ne variait et ne réagissait pas à l'excitation par la lumière durant à peu près vingt-quatre heures. Après ce laps de temps la tache prenait une coloration grise, et vers la fin de la seconde journée les traces de l'injection disparaissaient presque.

Ainsi toutes les toxines, qui ont manifesté une action sur les mélanophores, produisent, comme le démontrent les expériences exposées ci-dessus, un seul et même effet : elles agissent en qualité d'excitants qui provoquent la contraction des mélanophores. Leur action est purement locale et l'effet ne s'observe que lorsque la toxine se trouve directement en contact avec les cellules pigmentaires. Dès que la toxine employée commence à être absorbée, les mélanophores se remettent à fonctionner d'une façon normale, mais, pendant qu'elle se trouve en contact avec eux, ils perdent toute faculté de répondre à n'importe quels excitants.

Tous les excitants chimiques des mélanophores étudiés jusqu'à présent peuvent être divisés en deux groupes. A l'un se rapporteront ceux qui, comme quelques toxines examinées par nous, provoquent la contraction de ces cellules ; à l'autre, ceux qui, comme l'alcool, par exemple, forcent au contraire les mélanophores à se dilater.

Au nombre des excitants chimiques du premier groupe doivent être rapportées aussi ces substances, encore indéterminées, qui amènent le blanchiment *post mortem* de la peau des poissons, des amphibiens et des reptiles. Leur action sur les mélanophores est apparemment très semblable à celle des toxines. Bien que nos observations dans ce sens ne soient pas encore terminées, nous nous permettrons de citer l'expérience suivante : plusieurs morceaux de peau furent pris chez une perche devenue blanche après la mort et rapidement broyés à la poudre de verre. Ensuite la pâte obtenue fut diluée avec une petite quantité de solution physiologique. Près de 1/2 c. c. du liquide filtré fut introduit sous la peau de la joue d'une perche.

Quelques minutes après l'injection, tous les mélanophores de la région injectée se contractèrent. La perche fut ensuite mise dans l'aquarium et laissée jusqu'au lendemain. Le jour suivant il se trouva que tous les mélanophores avaient repris leur aspect antérieur. Il n'est pas rare de voir que les poissons et les amphibiens morts d'asphyxie ne changent pas leur coloration pendant un laps de temps relativement long.

Ainsi, par exemple, d'après les expériences de Lister (*l. c.*), on voit que des *Rana fusca*, asphyxiées dans l'atmosphère d'hydrogène ou d'acide carbonique, gardent leur coloration antérieure, et non seulement des exemplaires entiers, mais même des extrémités coupées.

Quand on les ramenait à l'air (après 2 à 9 heures de passage dans l'acide carbonique), ils blanchissaient quelque temps après. Ces expériences furent ensuite confirmées par Biedermann. A première vue, elles semblent contredire ce fait que les mélanophores se contractent après la mort de l'animal par suite de l'intoxication *post mortem*. Nous aussi nous avons observé que des perches asphyxiées dans de l'eau privée d'oxygène ne changent pas leur coloration pendant un temps relativement assez long. Cependant ces perches, 3 à 4 et même 6 heures après un séjour dans de l'eau privée d'oxygène, ramenées à l'air, ne manifestaient aucun blanchiment pendant un laps de temps assez prolongé. L'étude des mélanophores de ces perches a démontré que ces cellules étaient encore vivantes, et, bien que faiblement, répondaient à l'excitation électrique : ils faisaient, bien que très lentement, rentrer leur expansions. Biedermann, de son côté, a observé que des grenouilles, mortes d'asphyxie dans un bocal contenant de l'acide carbonique, blanchissaient après y avoir passé 24 heures. Il en a conclu très justement que l'acide carbonique provoque l'expansion des mélanophores en les amenant à un état d'affaiblissement. A notre avis c'est précisément par ce fait que peut s'expliquer le retard de l'effet de l'intoxication *post mortem* dans ces cas.

Ces phénomènes d'autointoxication peuvent avoir lieu non seulement après la mort de l'animal, mais aussi de son vivant. De nombreuses expériences sur l'influence de la circulation sur les mélanophores le prouvent, selon nous, d'une façon tout à fait convaincante.

Déjà Lister (*l. c.*) présentait de nombreuses preuves en faveur de la grande influence qu'a la circulation sur le changement de la coloration de la peau et démontrait que la cause du blanchiment *post mortem* n'est autre que l'arrêt de la circulation. Ensuite Hering et Hoyer (*l. c.*) tâchaient de démontrer que le système nerveux influe sur les mélanophores par l'intermédiaire du système vasculaire. Enfin, dans ces derniers temps, Biedermann (*l. c.*) a de nouveau analysé en détail cette question et a mis hors de doute la grande influence du système vasculaire sur les mélanophores. De toutes ces nombreuses observations on peut tirer la déduction suivante : là où, par suite de quelque cause que ce soit, survient un arrêt dans la circulation, on observe toujours aussi la contraction des mélanophores. Ainsi, par exemple, si chez une grenouille on serre complètement l'artère principale d'une des extrémités postérieures et qu'on y pratique une incision circulaire de la peau, alors, déjà 15-30 minutes après, les mélanophores manifestent leur maximum de contraction. Ou bien, si l'on coupe chez une *Rana fusca* foncée (dans la saison froide) toutes les parties molles de l'extrémité postérieure, à l'exception de l'artère et de la veine principales, les changements dans la coloration de la peau ne s'observent pas, aussi longtemps que la circulation du sang se produit régulièrement. Mais il suffit de pincer l'artère ou la veine pour que les mélanophores se mettent aussitôt à rentrer leurs expansions, et dans le premier cas, c'est-à-dire pendant l'anémie, l'effet est plus net et se produit plus vite. Si l'on rétablit ensuite la circulation, les mélanophores reviennent à leur état primitif. Biedermann (*l. c.*) a démontré, sur des grenouilles opérées de cette façon, que, même tous les nerfs coupés, le système nerveux continue à manifester son influence sur les mélanophores.

Ce fait a amené Biedermann à supposer que les mélanophores doivent s'innérer par voie tout à fait différente de celle que désigne toute une série d'expériences physiologiques et de recherches histologiques, à savoir : par les nerfs, qui passent avec les nerfs vasomoteurs. Cependant, personne jusqu'à présent n'a réussi à découvrir ces nerfs et à démontrer leur liaison avec les mélanophores.

Toutes les observations concernant l'influence directe du

système nerveux sur les mélanophores — observations parfois peu claires et contradictoires — obligent, au contraire, à penser que, en tenant compte des autres données, le système nerveux agit sur les cellules pigmentaires exclusivement par l'intermédiaire du système vasculaire. En provoquant, dans une région donnée de la peau, des changements dans la circulation, il amène par ce fait une intoxication locale, et, comme conséquence, la contraction des mélanophores. Il est indispensable de remarquer ici qu'avec le changement dans la circulation, pendant son arrêt, par exemple, ce ne sont pas seulement les mélanophores de la peau, mais aussi ceux qui recouvrent les parois des vaisseaux qui se contractent.

Tout l'ensemble des faits relatifs au changement dans la coloration des poissons, des amphibiens et des reptiles démontre que c'est l'indépendance très développée des mélanophores qui est le principal, et que, dans la majorité des cas, c'est grâce à elle que surviennent les différentes variations dans la coloration de la peau. Comme cas particuliers, nous devons considérer les changements produits dans les mélanophores par le système nerveux.

Cela ne doit pas paraître étrange, si l'on tient compte de ce que, dans la coloration de la peau, ce sont les mélanophores qui jouent le rôle principal. Il suffit d'une insignifiante contraction de leurs expansions, d'un très léger raccourcissement de ces dernières, en somme, d'un changement minime dans la configuration de ces cellules pigmentaires, pour que la peau prenne déjà une autre coloration.

Dans la partie suivante de notre travail nous présenterons encore quelques faits confirmant le point de vue énoncé ci-dessus.

EXPLICATION DE LA PLANCHE XXI

Fig. 1. — Mélanophore d'une perche avec les fibrilles variqueux. Coloration vitale par le bleu de méthylène; fixage par le picrate d'ammoniaque; *v.*, épaississement variqueux; *t*, fibrilles nerveuses insuffisamment colorées, s'arrêtant à l'épaississement variqueux.

Fig. 2. — Mélanophore de la vésicule vitelline d'un embryon du brochet, trois jours après l'écllosion; *o*, orifices formés par la soudure des expansions voisines.

Fig. 3. — Coupe transversale d'un tubercule de la peau du caméléon; fixage

par le sublimé et l'acide acétique; coloration par le carmin, suivie d'un lavage prolongé par une faible solution de l'acide picrique; *f*, fissures intracellulaires, par lesquelles les mélanophores envoient leurs expansions vers la périphérie; *ep*, épiderme; *mr*, terminaison des expansions des mélanophores; *M*, mélanophore.

Fig. 4. — Trois mélanophores (I, II et III) de la vésicule vitelline d'un embryon du brochet, deux jours après l'élosion.

Fig. 5. — Coupe transversale d'un tubercule de la peau du caméléon; fixage par le sublimé et l'acide acétique après un traitement, pendant une demi-heure par la toxine tétanique; *ep*, épiderme; *f*, fissures par lesquelles les mélanophores envoient leurs expansions vers la périphérie; *M*, mélanophore.

Fig. 6. — Quatre mélanophores de la vésicule vitelline d'un embryon du brochet, deux jours après l'élosion.

Fig. 7. — Coupe transversale de la *Hyla arborea* d'une coloration vert vif, ce qui correspond au maximum de contraction des mélanophores *M*; *ep*, épiderme; *xl*, xantholeucophores.

Fig. 8. — Mélanophores *M* et xantholeucophores *xl* de la perche, état d'expansion.

Fig. 9. — *Id.* après l'inoculation de la même région de peau par la toxine diphtérique; tous les mélanophores et xantholeucophores sont contractés.

Fig. 10. — Deux mélanophores I et II de la vésicule vitelline d'un embryon du brochet, trois jours après l'élosion; *N*, noyau.

Fig. 11. — Coupe transversale de la peau de la *Hyla arborea*; traitement par le *Vibrio Metchnikovi*; fixage par le sublimé et l'acide acétique; *ep*, épiderme; *xl*, xantholeucophores; *M*, mélanophores contractés (comparez *M* de la fig. 7).

Pouvoir préventif et pouvoir curatif du sérum humain dans l'infection due au Trypanosome du Nagana.

PAR LE Dr OSWALD GOEBEL

(Travail du laboratoire d'hygiène et de bactériologie de l'Université de Gand.)

On doit à MM. Laveran et Mesnil¹ la découverte d'une action bien intéressante que possède le sérum humain chez les animaux inoculés avec des Trypanosomes de Bruce. Chez les souris, ils ont reconnu à ce sérum un pouvoir préventif certain, quand on injecte les parasites en mélange avec le sérum, et une action curative dont l'efficacité est incomplète, les Trypanosomes disparaissant rarement d'une manière définitive du sang.

En outre, ces auteurs ont observé que le sérum chauffé à 62° est rendu inactif et qu'il perd peu à peu ses propriétés en vieillissant. Ils admettent qu'il renferme une substance nocive pour les Trypanosomes, agissant à la façon de l'acide arsénieux.

Nous avons repris l'étude du sérum humain au point de vue de ses propriétés protectrices et curatives en cherchant surtout à interpréter son mode d'action.

A. POUVOIR PRÉVENTIF

L'inoculation à la souris d'un mélange composé de 2 c. c. de sérum humain et d'une goutte de sang nagané n'est jamais suivie d'infection ; nos expériences, à ce point de vue, ne peuvent que confirmer celles de MM. Laveran et Mesnil.

En opérant de la même façon chez le cobaye, nous avons, au contraire, provoqué à coup sûr l'infection de l'animal ; pour protéger le cobaye nous avons dû réunir des conditions assez spéciales que nous allons exposer.

Tout d'abord l'infection n'a été évitée qu'au moyen de Trypanosomes ayant été en contact pendant plusieurs heures à 37° avec le sérum, comme on le constate dans l'expérience suivante :

1. A. LAVERAN, *C. R. Acad. Sciences*, 1^{er} avril 1902; LAVERAN et MESNIL, Traitement et prévention du Nagana, *Ann. Inst. Pasteur*, 25 novembre 1902, — *Trypanosomes et Trypanosomiases*, page 167.

4 cobayes reçoivent sous la peau 0,3 c. c. de sang de cobaye nagané additionné de 8 c. c. de sérum fœtal; les inoculations sont pratiquées immédiatement après la préparation des mélanges et après un séjour de durée variable à la température ordinaire ou à 37°. Un 5^e cobaye témoin reçoit à 0,3 c. c. de sang nagané mélangé avec 8 c. c. de sérum humain inactivé par chauffage, mélange qui a été mis préalablement pendant 2 heures à l'étuve.

	0,3 c. c. de sang nagané ajouté à	Moment de l'injection.	Durée de l'incubation ¹ .	
Cobaye 1.	8 c. c. sérum fœtal.	Immédiate.	6 jours.	Mort après 25 jours.
—	2. 8 c. c. —	Après 2 h. à 48°.	6 —	— — 47 —
—	3. 8 c. c. —	— 8 h. à 48°.	41 —	— — 60 —
—	4. 8 c. c. —	— 2 h. à 37°.		Survit.
—	5. 8 c. c. liq. physiol.	— 24 h. à 48°.	5 —	Mort après 24 jours.
—	6. 8 c. c. sér. humain à 64°	— 2 h. à 37°.	8 —	— — 23 —

1. Nous désignons ainsi, comme le font MM. Laveran et Mesnil, le temps qui s'écoule entre l'inoculation et l'apparition des parasites dans le sang.

Dans cette expérience les inoculations étaient faites sous la peau. Comme le démontrent les essais suivants, la région où l'inoculation est pratiquée a aussi de l'importance, de même que la façon dont on injecte le sérum et les Trypanosomes, le pouvoir préventif ne se manifestant que lorsqu'on les introduit réunis dans l'organisme.

	1 c. c. de sang nagané + 4 c. c. sérum.	
Cobaye 7.	Trypanosomes sous la peau, sérum dans péritoine	Mort après 12 jours.
— 8.	Trypanosomes + sérum sous la peau.	Survit.
— 9.	— + sérum dans péritoine.	Mort après 14 jours.

(Nous avons employé dans cette expérience un mélange de sérum fœtal et de sérum d'adulte.)

Nous devons cependant reconnaître que, même en opérant dans les conditions indiquées (séjour du mélange 2 heures à 37°, injection sous la peau), il nous est parfois arrivé d'éprouver des échecs résultant, sans doute, de ce que nous avons dû nous servir de sérum dont l'activité n'était nullement équivalente.

Dans beaucoup de nos essais, nous avons eu recours à des sérum de fœtus, recueillis au moment de la délivrance. Or,

MM. Laveran et Mesnil ont constaté que le sérum foetal est bien moins actif que le sérum d'adulte. Nous avons fait, dès le début, quelques expériences qui confirment leurs observations.

Comme nous ne connaissions pas à ce moment les conditions dans lesquelles on peut sûrement obtenir la survie des animaux, les injections des mélanges de Trypanosomes et de sérum de fœtus ou d'adulte ont été pratiquées sans séjour préalable à 37°.

	Inoculation sous-cutanée de 1 c. c. dépôt de Trypanosomes avec :	Incubation.			
			4 jours.	Mort après 15 jours.	21
Cobayet 0.	0,1 c. c. sérum foetal.	4	—	—	—
— 11.	4,0 c. c. —	7	—	—	—
— 12.	2,0 c. c. —	9	—	—	47
— 13.	0,4 c. c. sérum d'adulte.	7	—	—	38
— 14.	1,0 c. c. —	9	—	—	24
— 15.	2,0 c. c. —	45	—	—	30

On voit qu'après les injections de sérum d'adulte, la durée de l'infection est plus longue.

On est naturellement tenté d'attribuer l'activité plus grande du sérum, qui a été en contact avec les parasites à 37° pendant plusieurs heures, à une action nocive directe du sérum sur les Trypanosomes. Mais cette action est encore à démontrer, comme nous l'établirons plus loin. Il nous semble qu'après avoir séjourné pendant 2 heures à 37° dans le sérum, un grand nombre de Trypanosomes sont morts *spontanément*; le sérum humain n'aurait donc à exercer son action que dans un organisme où peu de parasites ont été introduits. Cette hypothèse se trouve confirmée par l'expérience suivante :

On laisse pendant 3 heures à 37°, les mélanges :

A. 6 c. c. sérum foetal frais + 1,0 c. c. de sang à Trypanosomes;

B. 6 c. c. sérum foetal inactivé par un chauffage à 64° pendant une demi-heure + 1,0 c. c. de sang à Trypanosomes;

C. 6.0 c. c. sérum foetal inactivé de la même manière + 1,0 c. c. de sang à Trypanosomes.

Ensuite, on ajoute au mélange A 6 c. c. de sérum foetal inactivé; à B 6 c. c. de sérum foetal frais et à C 6 c. c. de liquide physiologique. Les 3 nouveaux mélanges sont inoculés immédiatement sous la peau de 3 cobayes. Le cobaye qui a reçu le mélange C s'infecte après 6 jours; ceux qui ont reçu les mélanges A et B restent indemnes.

L'injection, pour être efficace, doit se faire sous la peau parce qu'en cet endroit la résorption du sérum se fait lentement et qu'ainsi les Trypanosomes restent longtemps en contact avec du sérum peu dilué. Il en est autrement quand le mélange est introduit dans le péritoine.

Chez la souris, on peut inoculer de grandes quantités de Trypanosomes et protéger l'animal avec de faibles doses de sérum (2 c. c.) parce que la masse du liquide préventif est très considérable par rapport à la masse du corps.

En d'autres termes, on pourrait dire que le sérum humain n'agit préventivement qu'à la condition de se trouver dans l'organisme pendant un temps assez long et à une concentration relativement forte.

Comme on le verra par la suite, le sérum humain est doué d'une activité bien plus grande chez l'animal infecté. En effet, des doses peu élevées font disparaître rapidement du sang des parasites extrêmement nombreux; sans doute, à l'action du sérum sur les parasites eux-mêmes s'ajoute alors celle de l'organisme luttant contre l'infection.

1. — *Le sérum humain exerce-t-il une action in vitro sur les Trypanosomes?*

L'examen de préparations fraîches ne permet pas d'affirmer que le sérum nuit à la vitalité de ces parasites. S'il possède une action毒ique sur eux, elle semble bien lente et peu marquée. En tout cas, elle ne se manifeste par aucune modification extérieure apparente des micro-organismes.

Nous avons, par des numérations, déterminé le nombre des Trypanosomes encore mobiles dans deux mélanges, l'un de Trypanosomes et de sérum humain frais, l'autre de Trypanosomes et de sérum humain rendu inactif par chauffage. Après 2 heures, le nombre des parasites mobiles était tombé de 65.265 par m. m. c. à 3.425 dans les deux mélanges. Le séjour en dehors de l'organisme vivant, surtout à une température de 37°, a donc pour conséquence à lui seul de diminuer considérablement le nombre des parasites vivants.

On ne peut guère songer à apprécier *in vitro* l'action des deux sérums, chauffé et non chauffé, pendant plus longtemps,

car, après 3 heures, la plupart des parasites y sont devenus immobiles et paraissent détruits. Et cependant, bien que les Trypanosomes se montrent également altérés dans les deux mélanges, on constate, en les inoculant au cobaye, que seul le mélange chauffé est encore infectieux.

Nous ne pouvons donc conclure à l'action trypanocide du sérum humain qu'en opérant *in vivo*; or, dans l'organisme, la destruction des parasites pourrait résulter d'une action indirecte du sérum.

Dans l'hypothèse où le sérum humain aurait sur eux une action nocive, on doit se demander si les Trypanosomes ne fixent pas une partie plus ou moins notable d'une substance à laquelle serait dû son pouvoir préventif. Nous avons tenté de répondre à cette question par l'expérience suivante :

Les Trypanosomes de 10 c. c. de sang d'un cobaye fortement infecté sont centrifugés, lavés au liquide physiologique et mis à digérer avec du sérum humain. Après contact plus ou moins prolongé, on éloigne les parasites et l'on ajoute au sérum quelques gouttes de sang d'un cobaye nagané; ce mélange sert aux inoculations. Des cobayes témoins reçoivent des Trypanosomes, additionnés de sérum humain n'ayant pas été en contact avec des parasites, à des doses correspondantes avec celles injectées aux animaux précédents.

Une difficulté sérieuse dans cette expérience résultait de l'incertitude où nous nous trouvions relativement à la dose justement préventive du sérum; si ce sérum était ajouté en excès, les Trypanosomes pouvaient n'être pas assez abondants pour enlever complètement la substance protectrice; s'il était injecté en trop faible quantité, au contraire, les témoins risquaient de n'être pas protégés.

Les résultats de ces essais n'ont pas tous été aussi nets que nous l'avions espéré. En se basant sur la durée plus ou moins longue du temps écoulé entre l'apparition des Trypanosomes dans le sang et le moment de l'inoculation, on peut néanmoins tirer parti de ces expériences. Il est d'observation constante que, chez les animaux inoculés avec des quantités égales du sang d'un même animal nagané, la durée de l'incubation diffère fort peu.

	Durée du contact.	3 gouttes de sang nagané plus :	Incubation.	
1 c. c. dépôt de trypanosomes + 3 c. c. sérum.....	2 h. à 37°.	sérum ayant été 2 h. à 37° avec Trypanosomes : cob. 20. sérum non digéré : cob. 21.	—	Survit.
1 c. c. dépôt de trypanosomes + 0.5 c. c. sérum.	2 h. à 37°.	sérum digéré : cob. 22. sérum non digéré : cob. 23.	42 jours.	Mort apr. 26 j.
0.8 c. c. dépôt de Trypanosomes + 4 c. c. sérum.....	24 h. à 22°.	sérum digéré : cob. 24. sérum non digéré : cob. 25.	10 — 15 —	— 17 j. — 20 j.
0.8 c. c. dépôt de Trypanosomes + 1.0 é. c. sérum.....	24 h. à 22°.	sérum digéré : cob. 26. sérum non digéré : cob. 27.	10 — 11 —	— 16 j. — 9 j.
0.9 c. c. dépôt de Trypanosomes + 4 c. c. sérum.....	4 h. à 37°.	sérum digéré : cob. 28. sérum non digéré : cob. 29.	12 — 10 —	— 14 j. — 6 j.

Comme on le voit sur ce tableau, il n'y a aucune différence notable à constater entre le pouvoir préventif du sérum ordinaire et celui du sérum qui a été en contact pendant 2 heures à 37° avec des Trypanosomes abondants. *L'essai avec 0, 5 c. c. de sérum non digéré et digéré semblerait même indiquer que le contact du sérum avec les parasites ne fait que le rendre plus actif.* Ce fait paradoxal se retrouve dans l'expérience suivante où nous avons opéré en même temps sur des souris et des cobayes avec les mélanges :

A. Trypanosomes et globules contenus dans 4 c. c. de sang nagané, centrifugés et lavés au liquide physiologique, + 9 c. c. sérum fœtal.

B. 4 c. c. de sang de cobaye normal + 9 c. c. sérum humain fœtal.

Les deux mélanges sont laissés à 37° pendant 2 heures, puis centrifugés et les liquides A et B séparés des dépôts sont ensuite additionnés chacun de 4,0 c. c. de sang nagané. Les souris sont inoculées immédiatement avec une partie de ces mélanges ; le reste demeure 2 heures à 37° puis est inoculé à des cobayes.

	Inoculation.	Incubation.	
Souris A.		—	Survit.
Souris B.		—	—
Souris C.	1 c. c. mélange A.	—	—
Souris D.		—	—
Souris E.		—	—
Souris F.		—	—
Souris G.	1 c. c. mélange B.	—	—
Souris H.		—	—
Cobaye 30.	2 c. c. mélange A.	—	—
Cobaye 31.		—	—
Cobaye 32.	2 c. c. mélange B.	12 jours.	Mort après 20 jours.
Cobaye 33.		12 —	— 25 jours.

Le sérum humain, qui a été en contact avec des Trypanosomes, loin d'être privé de son action préventive, se montre également dans cette série d'expériences doué d'un pouvoir protecteur plus accusé, chez les cobayes, que le sérum ordinaire. En tout cas, il apparaît clairement que les Trypanosomes n'enlèvent pas au sérum une quantité appréciable de substance préventive.

En guise de contre-épreuve, les Trypanosomes, après séjour dans du sérum humain pendant 2 heures à 37°, ont été recueillis par centrifugation et mis en suspension dans du liquide physiologique; inoculés à des cobayes, ils ont toujours infecté les animaux en expérience.

Néanmoins nous pensons que certaines réserves s'imposent; peut-être les Trypanosomes fixent-ils très lentement la substance protectrice ou n'en enlèvent-ils qu'une quantité trop minime pour que le pouvoir préventif s'en ressente. Des difficultés techniques ne nous ont pas encore permis d'élucider cette question.

II. — *Dans quelle catégorie de matières albuminoïdes faut-il ranger la substance à laquelle est liée l'action protectrice du sérum humain?*

Après avoir saturé 50 c. c. de sérum avec du sulfate de magnésie en substance et recueilli le précipité de globulines, nous avons lavé celui-ci avec une solution saturée de $Mg SO_4$, puis nous avons redissous par addition d'eau distillée. Le liquide à peu près clair, obtenu de cette façon, est soumis à la dialyse dans un sac de collodion; d'autre part les albumines recueillies

par filtration sont également dialysées. La dialyse n'a pas été poussée jusqu'à la disparition complète des sels, les Trypanosomes étant assez sensibles aux solutions hypotoniques¹.

Nous avons ensuite préparé les mélanges suivants :

2 c. c. albumine + 5 gouttes de sang nagané, Injection à souris *a* : *apparition des Trypanosomes après 4 jours.*

1 c. c. albumine + 5 gouttes de sang nagané. Injection à souris *b* : *apparition des Trypanosomes après 4 jours.*

2 c. c. globulines + 5 gouttes de sang nagané. Injection à souris *c*. Pas d'inf.

2 — — + 5 — — — — — — *d.* —

4 — — + 5 — — — — — — *e.* —

4 — — + 5 — — — — — — *f.* —

La substance préventive, d'après ces essais, paraît appartenir au groupe des globulines. En outre, elle est assez résistante puisque la précipitation par une solution saturée de sel magnésien lui laisse son activité.

Nous n'avons pu poursuivre plus loin l'étude des propriétés chimiques de cette substance. Aussi bien, son principal intérêt réside dans ses propriétés biologiques que nous avons essayé de déterminer.

III. — *La substance protectrice agit-elle comme l'une ou l'autre des substances connues que contiennent les sérum préventifs?*

Ce pourrait être une substance agissant directement sur la vitalité des Trypanosomes, comme celle que contient le sérum de rat blanc et qui tue les bactéries du charbon *in vitro*, ou celle du sérum d'anguille qui détruit les globules rouges de certains Vertébrés. On peut aussi *a priori* se la représenter comme une opsonine ou une cytotoxine modifiant les Trypanosomes de manière à les rendre phagocytables.

Enfin, la substance en question a peut-être une constitution analogue à celle des sensibilisatrices auxquelles les sérum bactéricides, hémolytiques, etc., doivent leurs propriétés caractéristiques et qui sont actives seulement avec l'aide d'une alexine.

Mais, comme on l'a vu plus haut, le sérum qui a été en contact avec les parasites, conserve tout son pouvoir préventif et les parasites eux-mêmes, après ce contact, sont aussi infectieux qu'auparavant; il semble dès lors bien probable que le sérum

1. Cf. GOEBEL. *Ann. Soc. de médecine de Gand*, 1906, t. LXXXVI, p. 2.

humain ne contient pas un principe actif comparable à celui des sérum bactéricides ou des sérum bactériotropiques. Ces sérum, en effet, sont inactivés absolument quand on les met en présence des microorganismes pour lesquels ils sont spécifiques.

Les expériences suivantes fournissent aussi quelques indications qui montrent que l'action préventive du sérum humain dans le nagana ne dépend pas de la présence d'une sensibilisatrice spéciale.

1. *Action de la température.* — MM. Laveran et Mesnil ont constaté que le sérum humain conserve environ la moitié de son activité après avoir été chauffé pendant 1 heure à 56°; or, on sait que si, à cette température, les sensibilisatrices sont probablement toutes inaltérées, la plupart des alexines, par contre, sont détruites. A 62°, ces mêmes auteurs ont constaté que le sérum a perdu la plus grande partie de son activité.

Nos expériences sur les cobayes ont donné les résultats suivants :

	1 c. c. dépôt de Trypanosomes ajouté à	Incubation.	
Cobaye 34.	3 c. c. sérum humain frais.	—	Pas d'infection.
Cobaye 35.	3 c. c. sérum humain chauffé à 57°	—	—
Cobaye 36.	3 c. c. sérum humain chauffé à 64°	5 jours.	Mort après 6 jours.

Les Trypanosomes avaient été en contact pendant 2 heures à 37° avec le sérum avant l'injection et il s'agissait d'un sérum d'adulte très actif. L'action sur les souris du sérum chauffé a été mise à l'épreuve dans une autre expérience. Du sérum humain fœtal est tenu respectivement à 59°, 61°, 63° et 65° pendant 35 minutes.

A 1. c. c. de chacun de ces sérum nous ajoutons 0. 2 c. c. d'un dépôt de Trypanosomes, puis 4 c. c. de liquide physiologique.

Souris A.	Sérum tel quel.				Survit.
Souris B.	— à 59°	Apparition des Trypanosomes apr. 5 j.	—	—	Mort apr. 8 j.
Souris C.	— à 61°	—	—	—	— 7 j.
Souris D.	— à 63°	—	—	—	— 4 j.
Souris E.	— à 65°	—	—	—	— 5 j.

On remarque que la dose de sérum et la masse des Trypanosomes restant les mêmes, la durée de l'infection est en rap-

port avec la température à laquelle le sérum a été porté. Il ne s'agit donc pas d'une substance qui se détruit complètement à une température déterminée. Peut-être y a-t-il une série de substances albuminoïdes partielles dont chacune a une température de coagulation ou de mise en inactivité différente. Cette expérience montre en outre que dans certains cas le sérum peut être déjà rendu inactif à 59°.

Pour se rendre exactement compte de l'influence du degré de température, il faut évidemment envisager, dans ces expériences, bien des facteurs; voir s'il s'agit d'un sérum fœtal ou d'un sérum d'adulte, d'un sérum très actif ou peu actif, si les Trypanosomes sont très nombreux ou rares, très virulents ou peu virulents. Aussi, toutes ces circonstances, dont quelques unes même ne peuvent être vérifiées qu'après coup, nous interdisent d'opposer les résultats de nos expériences à ceux obtenus par MM. Laveran et Mesnil.

Puisqu'il est acquis en tout cas que le sérum chauffé à 64° est dépouillé complètement de son activité, n'est-il pas possible de lui rendre son pouvoir préventif en l'additionnant d'un sérum purement alexique?

Le sérum fœtal étant notablement moins actif que le sérum d'adulte, ce fait pourrait être dû à sa très faible teneur en sensibilisatrice. On sait, en effet, entre autre par les travaux de Sachs¹, que le sérum de bœuf adulte est actif vis-à-vis des globules de cobaye alors que le sérum de fœtus bovin ne possède aucun pouvoir hémolytique. On a démontré, d'autre part, que ce défaut d'activité est bien dû à une absence de sensibilisatrice puisque la quantité de complément y est sensiblement la même que dans le sérum d'adulte. Il était indiqué, dès lors, de rechercher si le sérum d'adulte chauffé peut être réactivé par l'addition d'une dose de sérum fœtal humain insuffisante par elle-même pour qu'on puisse lui attribuer une action préventive.

Nous avons préparé dans ce but les mélanges suivants :

- A. 2 c. c. sérum d'adulte chauffé à 64° [+ 1, 0 c. c. sérum fœtal frais;
- B. 2 c. c. sérum d'adulte non chauffé + 1, 0 c. c. liquide physiologique.

Le liquide A est inoculé au cobaye 94 : *Infection après 8 jours.*
 Le liquide B est inoculé au cobaye 94 a : *Pas d'infection.*

A moins qu'elle ne soit détruite à 64°, le sérum humain ne

1. H. SACHS, *Munchener med. Wochenschrift*, 1904.

contient donc pas une sensibilisatrice pour les Trypanosomes qui se laisse compléter par l'alexine du sérum fœtal humain.

Nous avons essayé de réactiver le sérum d'adulte par du sérum d'autres espèces animales, notamment par du sérum de poule et par du sérum de porc. Ces essais, faits chez la souris, nous ont toujours donné des résultats négatifs.

2. *Absorption par des levures.* — Von Dungern¹ a constaté que des levures émulsionnées dans un sérum hémolytique lui enlèvent la propriété de dissoudre des globules rouges. Cette action est due à une fixation de l'alexine. Nous avons recherché si du sérum humain, digéré avec des levures, n'était pas dépouillé de ses propriétés protectrices.

4 c. c. de sérum humain fœtal récent sont tenus en contact pendant 2 heures à 37° avec 15 grosses anses de levures lavées à plusieurs reprises avec du liquide physiologique ; l'émulsion épaisse est ensuite centrifugée et le liquide de centrifugation additionné de 0,5 c. c. de sang à Trypanosomes. Un témoin est constitué par un mélange de 4 c. c. de sérum humain + 0,5 c. c. de sang à Trypanosomes.

Les deux tubes sont laissés 2 heures à 37°, puis leur contenu inoculé sous la peau à deux cobayes :

Cob. 93 (sérum humain digéré avec levures) ; *pas d'infection*.

Cob. 96 (sérum humain non digéré) ; *pas d'infection*.

Cette expérience montre aussi que le mode d'action du sérum humain n'est pas comparable au mécanisme que les sérum bactéricides ou hémolytiques mettent en jeu, puisqu'il n'y a pas intervention d'une alexine.

Il est à remarquer en outre que le tube qui renfermait le sérum et les levures et qui avait été additionné de Trypanosomes mélangés avec des hématies de cobaye, ne présentait aucune trace d'hémolyse après 2 heures de séjour à l'étuve, tandis que l'hémolyse était complète dans le tube renfermant le mélange de Trypanosomes, de globules de cobaye et de sérum humain. Puisque dans les deux cas les liquides se sont montrés protecteurs, on est amené à croire que la substance active du sérum est bien différente de celle qui provoque l'hémolyse, contrairement à la manière de voir de Nissle². Cet auteur soutient, en effet, que les substances qui altèrent les Trypanosomes sont identiques à celles qui modifient les globules rouges et il admet pour le sérum

1. VON DUNGERN, *Münchener med. Wochenschr.*, 1900.

2. NISSL, *Archiv f. Hygiene*, 1905 t. LIII.

humain une action nuisible sur les Trypanosomes, adéquate à son action hémolytique.

3. *Action des alcalis.* — Dans leurs expériences sur la multiplicité des alexines, Ehrlich et Sachs ont montré que certaines d'entre elles sont détruites par un contact plus ou moins prolongé avec un alcali. Nous avons essayé de mettre cette constatation à profit en opérant comme suit :

4 c. c. de sérum fœtal sont additionnés de 1. c. c. de solution normale d'hydrate de soude ; après 10 minutes on neutralise par la solution normale d'acide chlorhydrique et on ajoute 0,5 c. c. de sang à Trypanosomes. Le mélange après 2 heures de séjour à 37° est injecté sous la peau d'un cobaye ; un cobaye témoin reçoit la même dose de Trypanosomes en mélange avec du sérum auquel on a ajouté 2 c. c. de solution neutre (1 c. c. de solution normale de soude + 1 c. c. de solution normale d'acide chlorhydrique). Un 3^e mélange est constitué par 4 c. c. de sérum humain frais + 0,5 c. c. de sang à Trypanosomes.

Cob. 97 (sérum soumis à l'action de la soude, puis neutralisé) ; *infection après 9 jours.*

Cob. 98. (sérum additionné de liquide neutralisé) ; *pas d'infection.*

Cob. 99 ; (sérum humain frais) ; *pas d'infection.*

Le contact avec la soude fait donc perdre au sérum ses propriétés protectrices. Mais cette expérience ne permet pas d'affirmer que ces propriétés sont sous la dépendance d'une alexine. Il est probable que la substance *sui generis*, à laquelle il doit son activité, est détruite par le traitement à la soude.

4. *Formation d'un anticorps.* — La substance active en question est-elle capable de donner lieu à la formation d'un anticorps actif *in vitro* comme *in vivo* ?

Nos premiers essais ont été faits en mélangeant du sérum d'un lapin, traité par du sérum humain, à du sérum humain normal, mélange additionné de sang riche en Trypanosomes. Dans une première expérience, les mélanges ont été injectés dans le péritoine quelques minutes après addition des parasites.

EXPÉRIENCE II.

Cob. 100 : 1 c. c. de sang à Trypanosomes + 3 c. c. sérum humain fœtal (*témoin*) : Trypanosome *après 16 jours, mort après 60 jours.*

Cob. 101 : 1 c. c. sang à Trypanosomes + 3 c. c. sérum humain + 1 c. c. sérum antihumain : Trypanosome *après 4 jours, mort après 6 jours.*

Cob. 102 : 1 c. c. sang à Trypanosomes + 3 c. c. sérum humain + 2 c. c. sérum antihumain : Trypanosome *après 2 jours, mort après 5 jours.*

Cob. 403 : 4 c. c. sang à Trypanosomes + 3 c. c. sérum humain + 3 c. c. sérum antihumain : *Trypanosomes après 3 jours, mort après 6 jours.*

Dans cette expérience, l'action préventive du sérum a été insuffisante, l'injection avait été faite dans le péritoine, etc. On constate néanmoins que la période d'incubation et la durée totale de la maladie sont beaucoup plus longues chez le témoin que chez les animaux ayant reçu, en même temps que du sérum humain, une certaine dose de sérum antihumain.

Pour d'autres expériences, l'injection a été faite sous la peau à des cobayes.

EXPÉRIENCE II.

Cob. 404 : 4 c. c. sang à Trypanosomes + 4 c. c. sérum humain : *Pas d'infection.*

Cob. 405 : 4 c. c. sang à Trypanosomes + 4 c. c. sérum humain + 4 c. c. sérum antihumain : *Trypanosome après 9 jours, mort après 25 jours.*

EXPÉRIENCE III.

Cob. 406 : 0,5 c. c. sang à Trypanosomes + 4 c. c. sérum humain foetal. *Pas d'infection.*

Cob. 407 : 0,5 c. c. sang à Trypanosomes + 4 c. c. sérum humain foetal + 2 c. c. sérum antihumain : *Trypanosomes après 12 jours, mort après 30 jours.*

Dans l'expérience suivante, nous avons mis en parallèle l'injection immédiate des mélanges et leur injection après 2 heures de séjour à 37° :

Cob. 410 : 0,3 c. c. sang à Trypanosomes + 8 c. c. sérum humain (2 heures à 37°) : *Pas d'infection.*

Cob. 408 : 0,3 c. c. sang à Trypanosomes + 8 c. c. sérum humain (injection immédiate) : *Trypanosomes après 6 jours, mort après 25 jours.*

Cob. 409 : 0,3 c. c. sang à Trypanosomes + 8 c. c. sérum humain + 3 c. c. sérum antihumain (injection immédiate) : *Trypanosomes après 8 jours, mort après 30 jours.*

Cob. 411 : 0,3 c. c. sang à Trypanosomes + 8 c. c. sérum humain + 3 c. c. sérum antihumain (2 heures à 37°) : *Trypanosomes après 8 jours, mort après 23 jours.*

Des essais du même genre, faits chez la souris, ont donné des résultats qui concordent avec les précédents.

Nous sommes donc en droit d'affirmer que le sérum de lapin, immunisé contre le sérum humain, enlève à celui-ci son pouvoir protecteur lorsque les deux sérum ont été mélangés in vitro.

Restait à rechercher si les animaux, soumis à des injections répétées de sérum humain, s'infectent lorsqu'on leur inocule un mélange de sérum humain et de Trypanosomes, qui est inoffensif pour un animal non préparé.

2 cobayes reçoivent en 3 fois 10 c. c. de sérum humain sous la peau ; quelques jours après la dernière injection on leur inocule, en même temps qu'à 2 témoins, un mélange constitué par 2,7 c. c. de sérum humain et 0,5 c. c. de dépôt de Trypanosomes. (Le sérum de ces cobayes ne donnait avec le sérum humain aucun précipité appréciable ; le sérum de cobaye est, comme on le sait d'ailleurs, peu riche en précipitines).

	2.7 c.c. sérum humain + 5 c.c. sang à Trypanosomes.	Incubation.	
Cobaye 412.	Immunisé contre sang humain.	11 jours.	Mort après 20 jours.
— 413.	— — — — —	8 —	— — 47 —
— 414.	Non immunisé.	— —	Survit.
— 415.	— —	41 —	Mort après 20 jours.

La même expérience a été faite chez des souris qui avaient reçu au préalable 4 c. c. de sérum humain en 2 fois.

	2 c. c. sérum humain + 0.5 c. c. sang à Trypanosomes.	Incubation.	
Souris 1.	Immunisées contre sérum humain.	8 jours.	Morte après 10 jours.
— 2.	—	—	Survit.
— 3.	—	7 jours.	Morte après 9 jours.
— 4.	—	—	Survit.
— 5.	Non immunisées.	— —	Survit.
— 6.	—	— —	—
— 7.	—	8 jours.	Morte après 10 jours.
— 8.	—	— —	Survit.

Pour ces expériences, nous avons employé une dose protectrice assez faible de sorte que plusieurs animaux non immunisés ont succombé. Néanmoins, on constate une mortalité un peu plus considérable chez les animaux immunisés contre le sérum humain. Il semble bien qu'une certaine neutralisation du principe actif du sérum se produise dans l'organisme vivant chez les animaux immunisés, comme elle se produit *in vitro*.

Le sérum antihumain rend-il le sérum humain inactif par suite d'une réaction spécifique qu'on pourrait comparer à celle d'une toxine réagissant avec son antitoxine ? Suffit-il, pour lui

enlever son pouvoir protecteur, d'ajouter la dose préventive de sérum humain à un mélange de deux sérum précipitants quelconques, ou même, tout simplement, à une certaine quantité d'un sérum hétérologue?

A première vue, il semble qu'on doit avoir affaire à un phénomène spécifique ressemblant à la neutralisation du sérum d'anguille par son antisérum par exemple. Dans les deux cas ce sont des éléments cellulaires assez comparables, Trypanosomes ou globules rouges, qui sont protégés contre l'action propre d'un sérum.

Nous avons essayé d'élucider cette question de la façon suivante :

A une dose protectrice de sérum humain, on ajoute du sérum de cheval et du sérum de lapin immunisé contre le sérum de cheval et l'on injecte le mélange avec le précipité qui s'y est produit. Un témoin reçoit la même dose de sérum humain additionnée de sérum antihumain, un autre témoin cette dose de sérum humain additionnée de sérum de lapin normal. A tous ces liquides on ajoute 0.25 c. c. de sang nagané.

EXPÉRIENCE I.

Cobaye	Mélanges injectés : 0.25 c. c. de sang nagané ajouté à :	Incubation.	Mort après	Contrôles
116.	3 c. c. sérum humain + 3 c. c. sérum antihumain.....	5 jours.	21 jours.	—
117.	3 c. c. sérum humain + 3 c. c. sérum antihumain.....	5 —	22 —	—
118.	3 c. c. sérum humain + 3 c. c. sérum lapin normal	7 —	28 —	—
119.	3 c. c. sérum humain + 3 c. c. sérum lapin normal.....	8 —	26 —	—
120.	1 c. c. sérum cheval + 3 c. c. sérum anticheval.....	5 —	24 —	—
121.	1 c. c. sérum cheval + 3 c. c. sérum anticheval.....	5 —	42 —	—
122.	3 c. c. sérum humain + 2 c. c. sérum anticheval + 3 c. c. sérum cheval.....	7 —	36 —	—
123.	3 c. c. sérum humain + 2 c. c. sérum anticheval + 3 c. c. sérum cheval.....	7 —	48 —	—

Malheureusement la dose préventive de sérum paraît avoir été insuffisante dans cette expérience; nous ne pouvons donc utiliser ces résultats qu'en comparant la durée de la période d'incubation chez les animaux contrôles et chez les animaux soumis à l'action des mélanges précipitants de sérum cheval et anticheval.

On constate que l'apparition des parasites dans le sang

n'est pas plus précoce chez ces animaux (122 et 123). Le pouvoir protecteur du sérum humain ne paraît donc pas diminué par le fait que ce sérum a été mélangé à un sérum d'une espèce différente et qui a donné un abondant précipité avec son antisérum.

Nous avons repris cette expérience et préparé 3 mélanges dans les conditions suivantes :

Mélange A. 8 c. c. sérum humain foetal + 4 c. c. sérum lapin normal;
 — B. 8 c. c. — — + 4 c. c. — antihumain;
 — C. 8 c. c. — — + 4 c. c. — cheval + 4 c. c. sérum anticheval.

A chacun de ces mélanges a été ajouté 0,5 c. c. de sang à Trypanosomes.

EXPÉRIENCE II.

		Incubation
Cobaye 124.	4 c. c. mélange A.	9 jours.
— 125.	—	9 —
— 126.	4 c. c. mélange B.	6 jours.
— 127.	—	6 —
— 128.	4 c. c. mélange C.	8 jours.
— 129.	—	8 —

La dose protectrice dans l'expérience II étant encore insuffisante, nous avons fait de nouveaux essais avec un sérum anticheval particulièrement actif.

Mélange A : 8 c. c. sérum humain + 1,0 c. c. sérum lapin normal + 2 c. c. liquide physiologique (contrôle).

Mélange B : 8 c. c. sérum humain + 2 c. c. sérum antihumain + 1 c. c. liquide physiologique (contrôle).

Mélange C : 8 c. c. sérum humain + 2 c. c. sérum cheval + 1 c. c. sérum anticheval.

EXPÉRIENCE III.

	0,5 c. c. sang nagané plus :	Incubation	Survie.
Cobaye 130.	5 c. c. mélange A.	—	—
— 131.	5 c. c. —	—	—
— 132.	5 c. c. mélange B.	40 jours.	Mort
— 133.	5 c. c. —	10 —	—
— 134.	5 c. c. mélange C.	8 —	—
— 135.	5 c. c. —	10 —	—
— 136.	5 c. c. —	6 —	—
— 137.	5 c. c. —	8 —	—

EXPÉRIENCE IV.

	0,5 c. c. de sang nagané plus :	Incubation	Mort après
Souris 56.	0,5 c. c. sérum humain + 0,5 sérum antihumain.	5 jours.	9 jours.
— 57.	0,5 c. c. sérum humain + 0,5 sérum lapin normal.	7 —	10 —
— 58.	0,5 c. c. sérum humain + 0,5 sérum anticheval + 0,5 sérum cheval.....	7 —	40 —
— 59.	0,5 c. c. sérum anticheval + 0,5 sérum cheval...	3 —	5 —

La dernière expérience, faite avec les mélanges ci-dessus, a été surtout démonstrative :

A, Sérum cheval 1,0 c. c. + sérum anticheval 2,0 c. c. + sérum humain 4 c. c.

B, Sérum cheval 1,0 c. c. + sérum lapin normal 2,0 + sérum humain 4 c. c.

C — Liquide physiologique 1,0 c. c. + sérum anti-humain 2,0 c. c. + sérum humain 4 c. c.

A tous ces mélanges nous ajoutons 0,5 c. c. de sang à Trypanosomes.

EXPÉRIENCE V.

		Incubation	
Souris 60.	1 c. c. de mélange A (S. cheval + anticheval).	7 jours.	Mort après 9 jours.
— 61.	1 c. c. — A —	8 —	— — 44 —
— 62.	1 c. c. — A —	7 —	— — 40 —
— 63.	1 c. c. — B (contrôle).	—	Survit.
— 64.	1 c. c. — B —	—	—
— 65.	1 c. c. — B —	—	—
— 66.	1 c. c. — C (S. humain et antihumain.)	6 jours.	Mort après 40 jours.
— 67.	1 c. c. — C —	6 —	— — 10 —

Nous ne croyons pas pouvoir tirer des conclusions fermes de ces quelques expériences. Il en ressort toutefois que le sérum humain peut perdre son pouvoir préventif dans un mélange de sérum précipitants quelconques (cheval et anticheval) et qu'il n'est pas nécessaire, pour neutraliser ce pouvoir, de recourir à un antisérum spécifique. Il semble même que l'addition de sérum de lapin normal au sérum humain diminue son action protectrice.

5. — *Recherche des opsonines et des cytotoxines.* — Les travaux récents sur ces substances nous ont engagé à rechercher directement leur existence dans le sérum humain, en suivant à peu près la technique indiquée par Neufeld et Hüne¹.

Les leucocytes d'un exsudat péritonéal, obtenu chez le cobaye par inoculation de bouillon additionné d'aleuronate, sont lavés et émulsionnés dans du liquide physiologique; de cette émulsion épaisse, on met 3 gouttes dans de petits tubes avec 3 gouttes de Trypanosomes centrifugés du sang et 2 gouttes de sérum humain frais ou chauffé au préalable à 64°. Après 1 à 2 heures de séjour à l'étuve, le liquide en excès est enlevé et le dépôt réparti en frottis sur lames que l'on colore ensuite par le Giemsa.

D'autre part, voulant chercher si une action cytotoxique ne se produirait pas par une combinaison de sérum humain et de sérum d'une autre espèce animale, nous avons mis la même quantité de leucocytes dans des tubes renfermant 2 gouttes de sérum humain frais, additionnées respectivement de 2 gouttes de sérum de lapin, de sérum de poule, de sérum de souris, de sérum de cobaye sain, de sérum de cobaye nagané; chaque tube recevait en outre 3 gouttes de suspension de Trypanosomes. — Enfin, dans une autre série de tubes, nous placions 3 gouttes d'émulsion de Trypanosomes + 3 gouttes d'émulsion de leucocytes et 2 gouttes de sérum de lapin, de poule, de souris, de cobaye sain ou de cobaye nagané.

Sur toutes les préparations, faites au moyen des mélanges qui sont restés 1 heure à 37°, on retrouve un certain nombre de parasites ayant conservé leurs formes et leurs affinités pour les matières colorantes; mais la très grande majorité des Trypanosomes sont détruits; il n'en persiste plus que leurs restes plasmolysés, flagelle et noyau, celui-ci se présentant sous l'aspect d'une petite masse arrondie colorée en rouge. Le noyau a une forme assez caractéristique qui permet de le reconnaître dans le protoplasme des polynucléaires. Les restes des Trypanosomes sont seuls phagocytés et cette phagocytose s'observe avec la même intensité dans tous les mélanges; on peut la considérer comme un phénomène d'ordre banal. Jamais nous n'avons observé la phagocytose de Trypanosomes ayant leurs formes normales.

Après 3 heures de séjour à 37°, l'aspect des préparations est encore sensiblement le même, sauf que le nombre des parasites intacts est encore

1. NEUFELD et HÜNE. *Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte*, 1907, t. XXV, f. 2.

moindre, il semble aussi que les restes de noyaux sont beaucoup moins abondants.

Le sérum humain, seul ou additionné de sérum d'autres espèces animales, paraît donc dépourvu vis-à-vis des Trypanosomes de tout pouvoir opsonique ou cytotoxique, comparable à celui qui a été reconnu à divers sérum pour des Bactéries variées et même pour des éléments cellulaires de dimensions relativement grandes tels que des hématies.

Il resterait à examiner si le sérum humain ne manifeste aucun pouvoir cytotoxique dans les conditions expérimentales où l'on s'est placé, parce que les *microphages* du sang sont impuissants contre les Trypanosomes vivants. Le rôle des phagocytes ne pourrait-il pas être joué exclusivement par les *macrophages* de la rate, de la moelle osseuse, etc.? Des recherches ultérieures sur le phagocytisme au sein des organes parenchymateux élucideront cette question.

Il y a lieu, en tout cas, de rapprocher cette impuissance des leucocytes vis-à-vis des Trypanosomes du Nagana de leur pouvoir phagocytaire très considérable pour le *Trypanosoma lewisi*, constaté par MM. Laveran et Mesnil chez les rats immunisés activement ou passivement contre ce dernier parasite.

B. POUVOIR CURATIF.

Comme nous l'avons rappelé plus haut, MM. Laveran et Mesnil ont reconnu que le pouvoir curatif du sérum humain n'est pas absolu, en ce sens que presque toujours les Trypanosomes reparaissent dans le sang après un temps plus ou moins long; pourtant, dans deux cas, ils ont observé une guérison radicale des souris.

Nous avons étudié à notre tour cette action curative chez les souris et les cobayes. Chez la souris, conformément aux observations des auteurs précités, l'injection de 2 c. c. de sérum humain fait disparaître les parasites du sang.

Leur réapparition est d'autant plus tardive que le moment de l'injection est moins éloigné du début de l'infection, comme le démontre l'expérience suivante :

	Inoculation des Trypanosomes	Injection de sérum après :	Réapparition des Trypanosomes
Souris a.	Le 14 juillet.	1 jour, 15 juillet.	9 jours après l'injection.
Souris b.	—	2 jours, 16 juillet.	8 jours
Souris c.	—	3 jours, 17 juillet.	6 jours
Souris d.	—	4 jours, 18 juillet.	5 jours

Par une injection de sérum humain, on peut obtenir la disparition complète des parasites, même chez des souris fortement infectées; mais, cette action exigeant un certain temps pour se manifester, les animaux arrivés à la dernière période de la maladie meurent généralement sans que le nombre des Trypanosomes ait diminué d'une façon appréciable.

Les souris, dont le sang est débarrassé de ses innombrables parasites grâce au sérum, ne présentent aucun symptôme spécial; il ne semble pas exister chez elles de lésions organiques plus ou moins graves. Cependant, si l'on tue l'animal à ce moment, on constate que la rate est fortement hypertrophiée.

Il était intéressant de rechercher si les parasites ne se retrouvent pas dans cet organe et dans d'autres, comme on l'observe chez le cobaye après leur disparition spontanée au cours de l'infection. On sait que les Trypanosomes, presque complètement absents du sang à une certaine période, existent alors en grand nombre dans les testicules, les ganglions, etc.¹.

Nous avons examiné à ce point de vue quelques souris, chez lesquelles les parasites avaient disparu après une injection de sérum. Les Trypanosomes ayant reparu après quelques jours, on pratique une nouvelle injection et les parasites deviennent très rares dans le sang (1-2 par préparation fraîche).

On extirpe alors les ganglions inguinaux dont on fait des frottis; ceux-ci, colorés par le Giemsa, ne montrent pas de parasites.

Chez le cobaye, les choses se passent autrement. Comme on le verra plus loin, on peut aussi chez cet animal faire disparaître les parasites du sang, mais si, 24-48 heures après l'injection, on enlève les ganglions inguinaux, on y trouve des Trypanosomes assez nombreux,

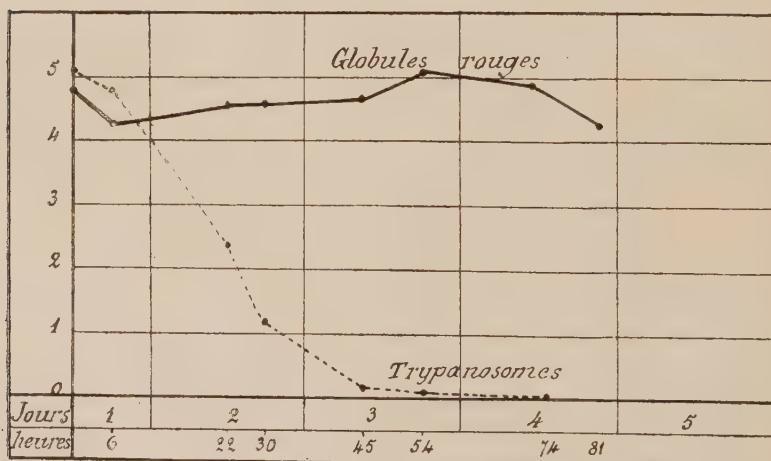
La persistance des parasites dans les ganglions du cobaye

1. Cf. VAN DURME, *Archives de parasitologie*, t. X, n° 2, 1906, et GOEBEL et DEMOOR, *Annales de la Société de médecine de Gand*, 1906.

traités par le sérum humain est à rapprocher de leur persistance dans ces organes lors des rémissions spontanées. Pour ce qui concerne l'action curative du sérum humain chez le cobaye, il y a lieu d'être réservé dans l'interprétation des faits afin de n'être point victime de simples coïncidences, une période de rémission du nombre des parasites étant de règle au cours de l'infection naganée chez le cobaye. Mais, après l'injection de sérum, la disparition des parasites est plus rapide et surtout plus complète; pendant plusieurs jours, on ne trouve plus un seul Trypanosome dans le sang, tandis que dans le cas de rémission spontanée, on en trouve encore toujours quelques unités.

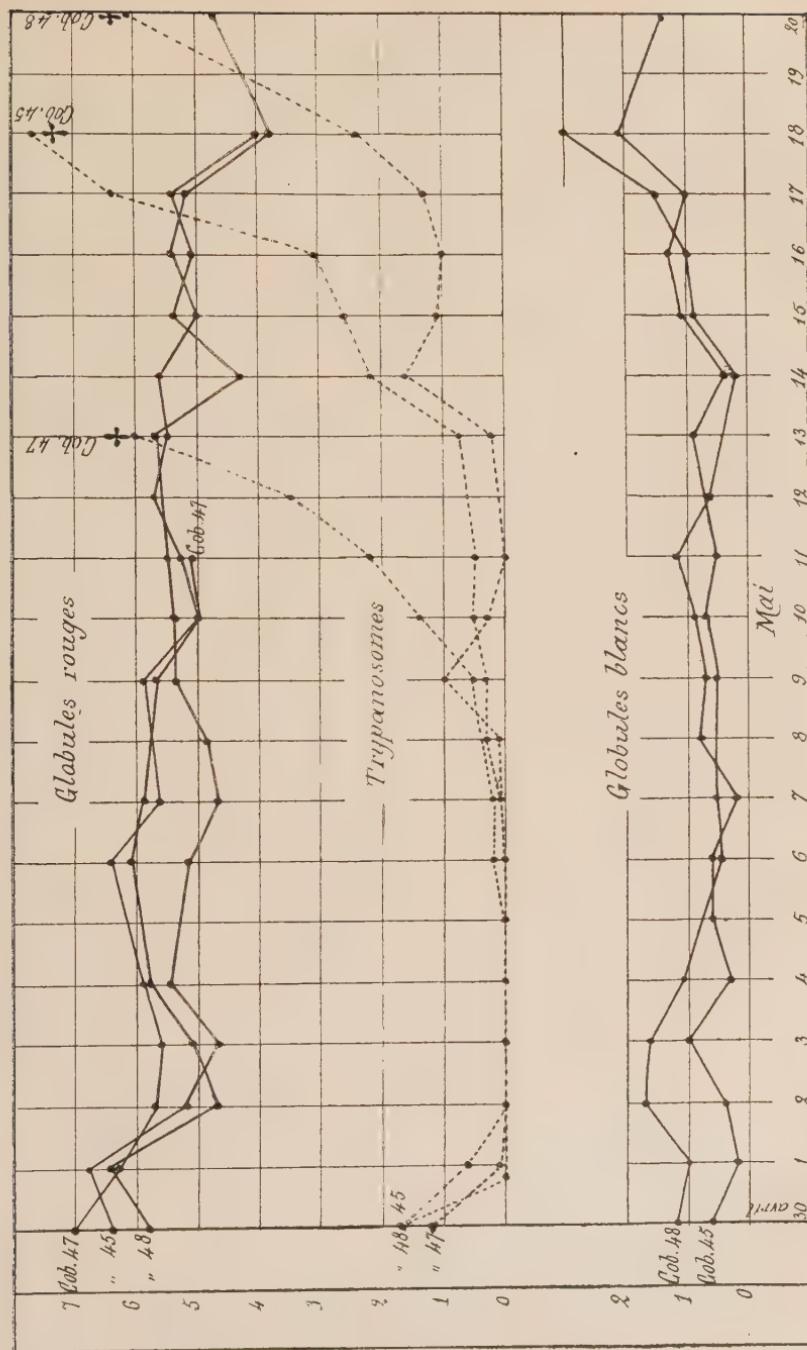
Nous avons déterminé le nombre des Trypanosomes par num. au moyen du compte-globules de Thoma-Zeiss.

En général la chute du nombre des Trypanosomes est assez régulière comme le montre le tracé ci-dessous chez un cobaye ayant reçu 5 c. c. de sérum humain.



N. B. Dans ce tracé et dans les suivants, chacune des grandes divisions correspond à 1,000,000 de globules rouges, à 400,000 Trypanosomes et à 40,000 globules blancs.

Il arrive parfois, pendant les premières heures qui suivent l'injection, que le nombre des Trypanosomes, loin de diminuer, continue à augmenter. Un exemple de ce fait est fourni par le cobaye H25 chez lequel nous avons pratiqué à diverses reprises la numération des Trypanosomes, des globules rouges et des



globules blancs. La première numération est faite 1/2 heure avant l'injection de 5 c. c. de sérum humain.

	Parasites.	Globules rouges	Globules blancs.
Avant injection.	384.375 par mmc.	7.200.000 par mmc.	7.500 par mmc.
Après 7 heures.	418.750 —	7.100.000 —	3.437 —
Après 24 —	156.250 —	6.700.000 —	4.250 —
Après 32 —	7.500 —	6.564.000 —	3.425 —
Après 46 —	9.375 —	6.500.000 —	5.625 —
Après 56 —	0 —	6.600.000 —	4.062 —

En établissant plusieurs tracés, on constate qu'ils présentent en général la même allure; toujours on voit une chute du nombre des parasites 24 heures après l'injection du sérum humain. Quand le nombre des parasites dans le sang n'est pas trop considérable, on peut même observer leur disparition complète 24 heures après. La rapidité de leur disparition est donc en rapport avec leur nombre initial.

De même que chez la souris, il arrive que le sérum soit sans action lorsqu'on intervient pendant les dernières périodes de la maladie.

Lorsqu'il y a une tendance à la rémission spontanée dans le nombre des parasites, l'action du sérum est accélérée et il agit à doses moindres. Au début de l'affection, les forces réactionnelles de l'organisme sont plus actives et se combinent sans doute avec l'action du sérum. Vers la fin de la maladie, par contre, l'organisme est probablement déjà fort affaibli; la phagocytose des parasites se fait probablement mal; en outre, le sang est dépouillé d'un élément important, l'alexine¹ qui joue peut-être un rôle important dans la défense contre l'infection naganée. La dose de sérum influe évidemment sur la rapidité avec laquelle s'accomplit la disparition des Trypanosomes, mais cette influence n'est ni constante, ni régulière; par contre, presque toujours, la durée de la période de disparition et la durée totale de l'infection sont sous la dépendance de la quantité de sérum.

Les courbes, page 903, montrent bien les variations dans le nombre des parasites et des globules rouges. Elles ont été dres-

¹ Cf. GOEBEL, *Annales de la Soc. de Méd. de Gand*, 1906. — Nous avons montré dans ce travail que chez le cobaye immunisé contre les globules de lapin et infecté en même temps de nagané, il y a disparition de la plus grande partie de l'alexine et diminution de la quantité de sensibilisatrice hémolytique.

sées pour 3 cobayes (45, 48, 47) inoculés simultanément. 7 jours après, leur sang renfermait sensiblement le même nombre de parasites ; on leur inocule alors dans le péritoine des doses décroissantes de sérum, soit : 6 c. c. au cobaye 48, 3 c. c. au cobaye 45 et 1 c. c. au cobaye 47.

L'injection de sérum ne paraît pas avoir d'influence bien notable sur le nombre des globules rouges ; la destruction des Trypanosomes est bien indépendante de toute action hémolytique. Le nombre des globules blancs aussi ne subit aucune variation notable. On ne constate pas de leucocytose marquée : tout au plus y a-t-il, 1 ou 2 jours après, une légère hausse dans le nombre des globules blancs. Enfin il semble bien que la phagocytose des parasites fait défaut dans le sang circulant.

La numération des parasites nous a encore rendu service pour l'étude de l'action exercée par divers facteurs sur le pouvoir curatif du sérum humain.

1. *Action de la température.* A 3 cobayes, chez lesquels le nombre des parasites était considérable, on injecte du sérum humain dans le péritoine :

Le cobaye 70 reçoit 7 c. c. de sérum fœtal frais, le cobaye 77, 7 c. c. de sérum fœtal chauffé 1/2 heure à 58°, et le cobaye 75, 7 c. c. de sérum fœtal chauffé 1/2 heure à 64°.

Chez le cobaye 75, le sang était beaucoup moins riche en parasites dès le début ; l'essai n'en est que plus probant si ces parasites peu nombreux ne disparaissent point par l'injection de sérum chauffé à 64°. Des numérasions répétées ont donné les résultats suivants :

	Nombre de Trypanosomes par mm. c.			Examen du sang en préparation fraîche.
	Cob. 70. (Sérum frais.)	Cob. 75. (Sérum à 58°.)	Cob. 75. (Sérum à 64°.)	
Avant l'injection.	281.250	356.250	42.500	
Après 17 heures.	0	171.875	6.250	
— 45 —	0	0	42.500	Pas de Trypanosomes chez les cobayes 70 et 77.
— 3 jours.	0	0	0	Pas de Trypanosomes chez 70 et 77. Plusieurs chez 75.
— 4 —	0	0	0	Pas de Trypanosomes chez 70 et 77. Plusieurs chez 75.
— 5 —	0	0	0	4 Trypanosome chez 70 et 77. Plusieurs chez 75.
— 6 —	0	0	18.750	Quelques Trypanosomes chez 70 et 77.
— 7 —	0	0	42.500	—
— 8 —	12.500	6.250	43.750	—
— 9 —	32.250	0	45.625	—
— 10 —	134.250	34.250	25.000	—
— 11 —	276.375	84.250	53.425	—

On voit par ce tableau que le pouvoir curatif du sérum chauffé à 64° a beaucoup diminué; on a pu toujours retrouver des parasites chez le cobaye 75 dont le sang, dès le début, contenait peu de Trypanosomes, sinon par la numération du sang dilué à 1 : 200, du moins en examinant une goutte de sang non dilué.

Dans l'expérience suivante, le résultat est plus net encore, les parasites étant plus nombreux avant l'injection de sérum, les cobayes ayant été injectés depuis 12 jours. A ce moment ils reçoivent 10 c. c. de sérum dans le péritoine.

Au cobaye 73, on injecte du sérum non chauffé, au cobaye 74, du sérum chauffé à 64°.

	COBAYE 73.	COBAYE 74.
Avant l'injection.	540.625	40.625
Après 22 heures.	312.875	84.375
— 2 jours.	0	25.000
— 3 —	0	121.875
— 4 —	0	393.750
— 5 —	0	468.750

Il semble cependant, d'après nos numérations, que le sérum humain, chauffé à 64°, renferme encore une certaine quantité de substance curative; on observe, en effet, une diminution passagère du nombre des parasites deux jours après l'injection.

2. *Action des levures.* En opérant de la même manière que pour l'étude du pouvoir préventif, nous avons cherché si le pouvoir curatif du sérum était diminué après son contact avec des levures.

Deux cobayes naganés reçoivent l'un 7 c. c. de sérum humain digéré au préalable 1/2 heure à 37° avec 10 grosses anses de levures lavées au liquide physiologique, l'autre 7 c. c. du même sérum non traité par les levures.

Le cobaye 64 avait été infecté de Trypanosomes 20 jours auparavant, le cobaye 74, 17 jours.

	Cob. 64 (sérum traité par levures.)	Cob. 74 (sérum non traité)	Examen en préparation fraîche.
Avant l'injection.	421.875	46.875	
Après 24 heures.	0	21.875	
— 48 —	0	0	
— 3 jours.	0	0	
— 4 —	0	28.425	1 Trypanosome chez le cob. 64.
— 5 —	0	118.750	1 — — 64.
— 6 —	0	621.875	1 — — 64.
— 7 —	40.625	Meurt.	

Nous avons répété cette expérience avec du sérum digéré avec des doses plus considérables de levures formant une émulsion très épaisse.

Le cobaye 75 était infecté depuis 13 jours, le cobaye B depuis 20 jours.

	Cobaye 75 (sérum traité par levures).	Cobaye 76 (sérum non traité).
Avant injection.	234.375	365.625
Après 24 heures.	0	0
— 2 jours.	0	0
— 4 —	0	0
— 6 —	0	6.250

La digestion prolongée du sérum avec les levures ne lui enlève donc nullement la propriété de faire disparaître les Trypanosomes du sang. Ce fait est bien en rapport avec ce que l'on a constaté au sujet du pouvoir préventif qui persiste dans ces conditions.

3. *Le sérum humain qui a été en contact avec des Trypanosomes conserve-t-il ses propriétés curatives ?*

On prépare les deux mélanges suivants :

A. 5 c. c. sérum fœtal + 2 c. c. dépôt de Trypanosomes obtenu par centrifugation.

B. 5 c. c. sérum fœtal + 2 c. c. de liquide physiologique.

Les mélanges sont laissés à 37° pendant 4 heures; on centrifuge A, puis les mélanges sont injectés respectivement aux cobayes 91 et 92 sous la peau. Les deux cobayes étaient infectés depuis 6 jours.

	Cobaye 91 (sérum digéré avec Trypanosomes).	Cobaye 92 (sérum non digéré).
Avant l'injection.	90.625	90.625
Après 17 heures.	0	0
— 2 jours.	0	0
— 4 —	0	0

Les animaux sont restés indemnes de Trypanosomes pendant 5 jours; ils sont morts à cette date.

4. Nous avons également fait quelques essais en vue de rechercher si le sérum de lapin immunisé contre le sérum humain est capable de neutraliser l'action curative de ce dernier lorsqu'on injecte les deux sérum mélangés.

MM. Laveran et Mesnil¹ rapportent les résultats d'une expérience instituée en vue de répondre à cette question. Ayant injecté à plusieurs reprises du sérum humain à un animal atteint de nagana, ils n'ont pu constater que ces injections donnaient lieu à la production d'un anticorps neutralisant à la longue le principe actif du sérum.

En présence des résultats assez constants obtenus avec des mélanges analogues éprouvés au point de vue de leur pouvoir préventif, nous pouvions nous attendre à les trouver inactifs également au point de vue de leur action curative appréciée par l'abaissement du nombre des Trypanosomes dans le sang.

Or, dans la plupart des essais, la chute du nombre des parasites a été aussi rapide quand on injectait les deux sérum chez un animal nagané que dans le cas où l'on traitait l'animal par du sérum humain seul.

2 cobayes (25 et 27), fortement infectés, reçoivent en même temps dans le péritoine, 5 c. c. de sérum humain; chez un 3^e cobaye (26), le sérum humain est additionné au préalable de 1 c. c. de sérum antihumain.

Nombre des parasites.	Sérum humain + sérum antihumain. (Cob. 26.)	Sérum humain.	
		Cob. 27.	Cob. 26.
Avant l'injection.	584.375	548.750	384.375
Après 5 heures.	400.000	484.375	418.750
— 24 —	325.000	234.375	156.250
— 30 —	109.375	125.000	75.300
— 45 —	48.875	18.750	9.375
— 54 —	25.000	6.250	0
— 3 jours.	50.000	6.250	0
— 4 —	212.500	48.750	3.425
— 5 —	350.000	38.500	9.375

1. LAVERAN et MESNIL, *Ann. Inst. Pasteur*, t. XVI, 1902, p. 803.

Comme on le voit, une diminution du nombre de Trypanosomes s'est produite rapidement après injection du mélange de sérum humain et de sérum antihumain; néanmoins, en poursuivant les numérations pendant plusieurs jours, on constate que les parasites redeviennent nombreux et en bien moins de temps chez ce cobaye que chez les deux autres.

Il semble donc que l'activité de la substance curative, imperfectement neutralisée, s'est épuisée plus rapidement chez lui que chez les deux autres animaux.

Plusieurs expériences du même genre ont donné des résultats analogues. Nous rapportons dans le tableau ci-dessous les numérations faites chez deux autres cobayes.

L'un (443) avait reçu 6 c. c. de sérum fœtal + 4 c. c. de sérum antihumain, l'autre (444) 6 c. c. de sérum fœtal + 4 c. c. de liquide physiologique en injection intrapéritonéale;

	Sérum humain + sérum antihumain. (Cob. 443.)	Sérum humain (Cob. 444.)	Examen en préparat. fraîches.
Avant l'injection.	443.625	78.125	
Après 12 heures.	468.750	12.500	
— 24 —	37.000	0	
— 34 —	0	0	
— 2 jours.	0	0	

Dans cet essai, la dose de sérum antihumain a été plus forte que dans l'essai précédent (4 c. c.); la chute du nombre des Trypanosomes est moins rapide que chez le témoin, mais, néanmoins, après 34 heures, les parasites ont presque tous disparu.

Ces expériences montrent donc qu'un mélange de sérum humain et de sérum antihumain, qui paraît bien neutre et qui est inactif quand on examine son pouvoir préventif, contient néanmoins une quantité encore appréciable de substance active puisque ce mélange est manifestement curatif.

CONCLUSIONS

1. Le sérum humain, comme l'ont reconnu les premiers MM. Laveran et Mesnil, possède une action préventive certaine et une action curative limitée contre l'infection de la souris par le Trypanosome de Bruce. Il exerce la même action préventive contre l'infection du cobaye par ce parasite, mais, pour que cette action se manifeste chez cet animal, il faut se

placer dans certaines conditions, telles que le contact prolongé des parasites avec le sérum à la température de l'étuve, l'injection du mélange sous la peau, etc.

2. Le sérum humain, digéré à 37° avec des Trypanosomes, ne perd pas ses propriétés préventives et curatives ; les parasites qui y ont séjourné ont conservé toute leur infectiosité.

3. Le sérum est sans activité au point de vue préventif quand il a été chauffé à une température voisine de 64° et quand il a été traité par un alcali. Il garde ses propriétés après avoir été en contact avec des levures.

4. Un mélange de sérum humain et de sérum antihumain est dépourvu de toute action protectrice. L'action curative de ce mélange n'est pas supprimée ; elle est seulement diminuée.

5. D'autre part des sérum d'espèces animales diverses, additionnés ou non de leur antisérum, sont aussi capables de dépouiller le sérum humain de son pouvoir préventif.

6. La substance préventive se comporte comme une globuline ; elle est précipitée par le sulfate de magnésie à saturation.

7. Le sérum humain n'agit ni préventivement ni curativement par un mécanisme analogue à celui des sérum hémolytiques, avec le concours d'une alexine et d'une sensibilisatrice. La perte de ses propriétés par le chauffage, par le vieillissement (Laveran et Mesnil), par l'action des alcalis peut s'expliquer autrement que par une destruction de l'alexine.

L'absence de toute fixation *in vitro* par les Trypanosomes d'une substance à laquelle le sérum devrait son activité, de même que l'action négative des levures à ce point de vue, et l'impossibilité de réactiver le sérum chauffé au moyen de sérum humain foetal ou de sérum d'autres espèces animales, plaident encore en faveur de l'hypothèse d'une substance agissant sans l'intermédiaire d'une alexine.

8. Le sérum humain ne manifeste aucune propriété opsonique ou cytotoxique vis-à-vis des Trypanosomes. En tout cas, il ne modifie pas les parasites de manière à en faire une proie facile pour les leucocytes.

Contribution à l'étude des Trypanosomiases de l'Afrique occidentale.

QUELQUES MODIFICATIONS DE VIRULENCE

PAR M. CAZALBOU

Vétérinaire en 1^{er} au 10^e régiment d'artillerie.

Les recherches poursuivies pendant ces dernières années, en Afrique occidentale, ainsi que les travaux effectués par M. Laveran¹ à l'Institut Pasteur, ont démontré que les Trypanosomiases devaient être placées au premier plan du cadre nosologique de cette vaste contrée. C'est ainsi qu'on connaît actuellement :

1^o La Mbori (*Trypanosoma Evansi* var.) qui frappe les Camélidés et les Equidés du Sahara et du Sahel ;

2^o Le Tahaga (*Tr. soudanense*) qui, d'après les recherches de M. Laveran, doit être assimilé aux trypanosomiases algériennes connues sous les noms de El Debab et de Mal de la Zousfana ;

3^o La Souma (*Tr. Cazalboui*) des Equidés et des Bovidés du Soudan ;

4^o Le Baléri (*Tr. Pecaudi*) des Equidés et probablement aussi des Bovidés soudanais ;

5^o La Trypanosomiase des chevaux de Gambie (*Tr. dimorphon*), signalée en divers points de la Guinée, de la Gambie et du Sénégal ;

6^o La Trypanosomiase humaine (*Tr. Gambiense*), assez rare dans l'ensemble de la contrée étudiée.

On sait que, pour une espèce pathogène donnée, la virulence est variable : 1^o avec l'espèce animale inoculée ; 2^o avec l'origine du Trypanosome étudié ; 3^o enfin, quoiqu'à un degré assez faible, avec les passages par espèces animales déterminées².

Si ces deux premières influences sont bien connues, des résultats multiples et diffus ont été publiés sur le compte du troisième facteur signalé.

Aussi croyons-nous devoir faire connaître certaines modi-

1. A. LAVERAN, Sur les Trypanosomiases du Haut-Nigér, ces *Annales*, mai 1907, et *Acad. des Sciences*, 29 juillet 1907.

2. A. LAVERAN et F. MESNIL, *Trypanosomes et Trypanosomiases*, Paris, 1904.

sifications de virulence constatées au cours d'expériences assez nombreuses effectuées en Afrique occidentale. Ces modifications ont été notées à l'occasion d'assez grands déplacements dans la colonie, qui ont mis dans nos mains des animaux d'origines diverses.

Les travaux ont porté sur les *Trypanosoma dimorphon*, *soudanense* et *Evansi* (var. *Mbori*) ; des résultats parfaitement comparables ont été obtenus.

I. *Trypanosoma dimorphon*.

Le 6 décembre 1903¹, 16 chevaux du 2^e escadron de spahis sénégalais partent en mission de Ségou à Friguiagbé, point terminus du railway de la Guinée française, par les hautes vallées du Niger et du Tankisso. Ils sont de retour à Ségou le 29 mars 1904. Sur cet effectif, deux chevaux rentrent atteints de la Trypanosomiase des chevaux de Gambie ; l'un d'eux (A) meurt le 5 novembre 1904 ; l'autre, paraissant en voie de guérison, est réformé et vendu le 27 mars 1905.

A. ÉTUDE EXPÉRIMENTALE SUR LE CHIEN

No 4. Le virus est inoculé à une chienne de 4 mois, en parfait état, originaire de Ségou. À cet effet, on injecte dans le tissu conjonctif du pli du flanc 10 c. c. de sang du cheval A. Incubation de 8 jours ; les premiers parasites apparaissent avec une température de 39°,5 ; on note ensuite une fièvre rémittente ne dépassant pas 40° ; la mort survient le 85^e jour, à 37°,5. Les Trypanosomes, assez fréquemment visibles, sont plus nombreux dans les derniers jours.

Symptômes : amaigrissement visible dès le 45^e jour, bientôt suivi de la saillie des côtes et d'un développement anormal de l'abdomen. Puis, faiblesse accusée, décoloration progressive des muqueuses : dilatation continue de l'abdomen due à l'hypertrophie de la rate et à une légère ascite. L'appétit n'a pas subi d'altérations sensibles ; de temps en temps, apparaît de la diarrhée noirâtre. Dans la dernière semaine, on assiste à l'apparition de désordres nerveux inattendus. Il y a dysphagie ; au moment où le bol alimentaire va traverser le pharynx, la malade est secouée de violents mouvements de vomissement ; pendant ces efforts, elle marche automatiquement en gémissant, pour aboutir à un aérejet de matières liquides verdâtres. Elle recommence le repas interrompu et les mêmes phénomènes se reproduisent. Les jours suivants, le tableau s'aggrave et des crises épileptiformes apparaissent. En décubitus latéral, la malade éprouve de violentes contractions cloniques généralisées ; les mâchoires battent l'une contre l'autre et blessent la langue,

1. L. CAZALBOU, Sur l'existence de *Trypanosoma dimorphon* en Guinée française, *Biologie*, 4 mars, 1905. — Du même, Étude expérimentale de *Trypanosoma dimorphon* chez le chien, *Soc. Cent. de Méd. Vét.*, 30 juillet 1906, rapport Vallée.

la salive est abondante, les yeux sont fixes : les membres, rigides, se meuvent d'abord violemment et en tous sens, puis, quand l'attaque s'atténue, ils reproduisent l'allure du trot. Peu à peu, l'excitation disparaît et tout rentre dans l'ordre ; au bout de quelques instants, la malade se laisse choir tout à coup, la queue se relève doucement et les convulsions se répètent, avec les mêmes plaintes ; bientôt arrive l'agonie. Sous les efforts des contractions musculaires généralisées, se produit une expulsion de matières diarrhéiques noirâtres et la mort ne tarde pas à clôturer la scène.

Lésions : la rate présente un développement énorme. Elle pèse 155 grammes pour un animal de 7 $\frac{1}{2}$ kg. Elle est régulièrement hypertrophiée et mesure 27 centimètres de long sur 9 centimètres dans sa plus grande largeur. Le foie est légèrement grossi ; la vésicule biliaire est distendue par de la bile noirâtre ; le gros intestin et le rectum renferment une certaine quantité de matières colorées en noir verdâtre et diffluentes ; dans la cavité abdominale, 20 c. c. de liquide épanché, jaune citrin, limpide ; lésions de péritonite chronique sur la séreuse du plancher abdominal.

Le système lymphatique ganglionnaire est envahi en entier : ganglions cervicaux, sous-glossiens, pré-scapulaires, poplitées, grossis ; sur la coupe, la section est rougeâtre ou grisâtre foncé.

N° 2. — Chien, 2 mois et demi, originaire de Ségou ; reçoit 0,75 c. c., de sang du chien précédent, prélevé dans la jugulaire tout de suite après la mort. Les Trypanosomes apparaissent le 11^e jour et offrent ensuite une évolution sub-continue ; ils sont plus nombreux dans les derniers jours. Température maxima 39 $^{\circ}$ 5 avec une poussée à 40 $^{\circ}$, la veille de la mort. L'animal succombe le 29^e jour.

Symptômes : en dehors de l'amaigrissement, déjà sensible au 15^e jour, on constate, vers le 20^e jour, des efforts de vomissements accompagnés de diarrhée verte ou noire, de la distension des parois abdominales. Le dernier jour, on note de la chorée diaphragmatique, bientôt suivie de contractions musculaires généralisées ; pendant l'agonie, abondante diarrhée noirâtre.

Lésions : développement considérable de la rate (18 centimètres de long) et hypertrophie ganglionnaire générale.

Au moment de la mort (4 février 1903), nous avions quitté Ségou pour effectuer une mission d'études dans le Moyen-Niger. Pour conserver *Tr. dimorphon*, venu fortuitement de la Guinée au Soudan, nous l'avons entretenu sur des chiens achetés dans toute la vallée du fleuve entre Ségou et Niamey. Les divers degrés de résistance offerts par ces animaux, d'origines diverses, constituent précisément l'un des points intéressants de ce travail.

N° 3. — Chien, 8 mois, originaire de Nou, près de Diafarabé, en bon état. Inoculé dans le tissu conjonctif du pli du flanc le 4 février 1903, avec un tiers de c. c. de sang du n° 2, prélevé dans la jugulaire deux heures après la mort. Incubation de 7 jours ; Trypanosomes abondants, surtout les 14^e et 15^e jours, ainsi que dans la dernière période ; pas d'hyperthermies accusées ; température maxima : 39 $^{\circ}$ 5.

Vers le 15^e jour, on remarque de la distension abdominale ; sur la fin, convulsions et plaintes analogues à celles déjà signalées. Les contractions

provoquent l'expulsion d'une urine fortement colorée et de matières diarrhéiques abondantes et verdâtres; mort le 23^e jour.

Lésions : rate considérable (30 centimètres de long sur 12 centimètres dans sa plus grande largeur). La plupart des ganglions lymphatiques sont hypertrophiés.

N^o 4. — Chien âgé de 5 mois, en assez mauvais état, originaire de Farabongo (sur le marigot méridional de Goundam). Reçoit, le 26 février 1903, 2 c. c. de sang du n^o 3, prélevé dans la jugulaire au moment de la mort.

On assiste ici au développement d'un type aigu de l'affection. Les hématozoaires apparaissent le 5^e jour et présentent une évolution continue; la température se meut entre 38° et 39°. Peu de symptômes marqués, en dehors d'une certaine tristesse; la mort survient le 10^e jour, après une agonie de 3 heures, au cours de laquelle se produisent les désordres nerveux déjà signalés, accompagnés de diarrhée et de plaintes.

Rate hypertrophiée; ganglions inguinaux, poplités, pré-scapulaires grossis.

N^o 5. — Chien âgé de 5 mois, en mauvais état, originaire de Balé (en aval de Bambo). Inoculé le 7 mars 1903 dans le pli du flanc, avec 4 c. c. de sang du chien précédent prélevé dans la jugulaire au moment de la mort. Les parasites apparaissent le 4^e jour et sont assez nombreux jusqu'aux derniers moments; mort le 11^e jour; ici encore nous constatons un type aigu. La température est ascensionnelle de l'invasion à la mort, où elle atteint 40°, 3. La fin est précédée de contractions épileptiformes et d'évacuations diarrhéiques noirâtres.

Hypersplénie accusée; la rate mesure 20 centimètres sur 6; les ganglions lymphatiques sont légèrement grossis.

N^o 6. — Chien âgé de 4 mois, originaire de Bourem, en bon état d'entretien. Inoculé le 19 mars 1903 avec 5 c. c. de sang du n^o 5, puisé à la mort dans la jugulaire. Incubation de 4 jours: Trypanosomes surtout nombreux aux derniers moments; la mort survient le 11^e jour; les symptômes terminaux sont toujours les mêmes : convulsions, plaintes, battement des mâchoires, diarrhée noirâtre.

Rate de 16 centimètres sur 6; hypertrophie des ganglions lymphatiques.

N^os 7 à 17. — 11 chiens ont été encore inoculés dans les mêmes conditions, c'est-à-dire avec du virus prélevé à la mort des malades : chez tous, on a pu constater une évolution parasitaire sub-continue avec des hématozoaires plus nombreux dans les derniers jours, des symptômes nerveux semblables et des lésions spléniques et ganglionnaires accusées.

Nous résumons l'ensemble de l'expérience dans le tableau suivant.

N ^o d'ordre.	Age (mois).	Origine.	Quantité de sang inoculée (c. c.).	Durée de l'incubation (jours)	Durée de la maladie (jours).
—	—	—	—	—	—
Chien n ^o 1.....	4	Ségou.	10	8	84
—	2.....	2 1/2 Ségou.	0,75	11	29
—	3.....	8 Nou.	1/3	7	23
—	4.....	5 Farabongo.	2	5	10

Chien n°	5.....	5	Balé.	4	4	41
—	6.....	4	Bourem.	5	4	41
—	7.....	8	Dountzou.	4/2	4	41
—	8.....	6	Nyamey.	10	9	18
—	9.....	5	Nyamey.	4	5	8
—	10.....	3	Korioumé.	Quelques gouttes.	4	40
—	11.....	7	Niafounké.	1/2	13	69
—	12.....	5	Dountzou.	1/2	6	40 1/2
—	13.....	7	Egnedèche.	1	6	9
—	14.....	10	Dountzou.	1/4	6	42
—	15.....	10	Ségou.	1	14	88
—	16.....	14	Gao.	1/3	8	49
—	17.....	3 1/2	Ségou.	1	16	34

Rappelons d'abord qu'au moment de la mort les Trypanosomes sont généralement nombreux dans le sang. La quantité de sang inoculée est donc, de ce fait, un bon élément d'appréciation de la richesse virulente du liquide.

L'examen du tableau permet les remarques suivantes :

1^o La quantité de virus inoculée dans le tissu conjonctif sous-cutané ne paraît pas avoir d'influence sur le type clinique de l'affection. C'est ainsi qu'une injection de 10 c. c. entraîne une affection subaiguë (n° 8-18 jours) et que quelques gouttes seulement de sang virulent provoquent le développement d'un type aigu (n° 10-10 jours);

2^o L'âge n'apporte pas d'influence appréciable sur la durée de la maladie, tout au moins sur des animaux de 2 à 14 mois, puisqu'une chienne de 8 mois meurt en 11 jours (n° 7) et un chien de 4 mois, en 84 jours (n° 1);

3^o La dernière période est marquée par des désordres nerveux, se traduisant par des plaintes, des convulsions, des évacuations diarrhéiques bilieuses; ces phénomènes sont plus bruyants dans les formes chroniques;

4^o On trouve constamment de l'hypersplénie et de l'hypertrophie ganglionnaire; ces lésions sont d'autant plus accusées que l'affection présente une plus longue durée;

5^o Sur les 17 animaux morts de Trypanosomiase, il s'est produit 9 cas du type aigu (mort survenue du 8^e au 11^e jour), n°s 4,5,6,7,9,10,12,13,14; on a observé 4 cas du type subaigu (de 18 à 29 jours), n°s 2,3,8,16, et enfin 4 cas du type chronique (de 34 à 88 jours), n°s 1,11,15,17;

6^o Tous les types aigus se sont manifestés sur des animaux d'origine saharienne (vallée aval de Tombouctou),

Tous les types chroniques ont été constatés sur des chiens achetés entre Ségou et Tombouctou.

Des résultats semblables ayant été obtenus avec *Trypanosoma soudanense* et *Tr. Evansi* (Mbori), nous verrons, au cours de cette étude, comment ces faits peuvent être interprétés.

B. ÉTUDE EXPÉRIMENTALE SUR LE CHEVAL.

Un cheval âgé de 6 ans, en bon état, originaire de Bandagara, reçoit, le 10 octobre 1905, dans la jugulaire, 0 c. c. 5 de sang du chien n° 15, assez pauvre en parasites; l'animal s'infecte.

Les Trypanosomes apparaissent le 12^e jour et, à plusieurs reprises, pendant les deux premiers mois de l'infection; ils deviennent ensuite plus rares. On note de la fièvre intermittente avec une température maxima de 40°, et quelques minima à 36°-35°,3.

La symptomatologie est très discrète. On note, à de rares intervalles, de légers relâchements des testicules et un larmoiement à peine sensible.

A notre départ de Ségou, 3 mois et demi après l'infection, le malade était toujours infecté et n'avait pas sensiblement maigri. Depuis cette époque et jusqu'au 1^{er} août 1906, on a constaté, à des intervalles assez longs, des accès de fièvre allant à 39°,5, semblant indiquer que l'infection subsistait.

C. ÉTUDE EXPÉRIMENTALE SUR LE RAT GRIS.

Un rat gris reçoit, dans le tissu conjonctif hypodermique, un quart de c. c. de sang du chien n° 1, prélevé le 84^e jour de la maladie; les parasites apparaissent le 9^e jour, augmentent de nombre les jours suivants jusqu'à la mort qui se produit le 19^e jour. — Hypersplénie très marquée.

Deux rats gris inoculés sur le chien n° 17, au 21^e jour de la maladie, présentent une incubation respective de 7 et 9 jours; ils succombent les 29^e et 30^e jours. Rate hypertrophiée.

ÉTUDE DU PARASITE. — Pas plus que Laveran, nous n'avons trouvé les formes signalées d'abord par Dutton et Todd. Nous avons constaté dans de nombreuses préparations une petite forme de 12 à 13 μ environ de long sur 1 μ ,5 de large et une forme longue de 25 μ en moyenne sur 1 μ ,5.

Le protoplasme se remarque par son affinité pour le bleu; des amas de matière cyanophile existent assez souvent dans les formes chroniques. Il n'a jamais été vu de flagelle libre, ni dans la grande ni dans la petite forme; la membrane ondulante est toujours peu marquée. La forme courte s'est montrée plus abondante dans le type aigu et la forme longue, plus fréquente dans le type chronique. Enfin, un dernier caractère propre à *Tr. dimorphon* a été noté: la progression spéciale du parasite dans le sang frais rappelant assez exactement les mouvements du têtard.

La description récente de *Tr. Pecaudi*¹ permet de penser que Dutton et Todd, Martin², Thiroux et Teppaz³ ont eu affaire, pour une partie, à *Tr. Pecaudi*.

II. *Trypanosoma soudanense*⁴. Première série.

En 1905, à notre passage à Gargouna, centre d'élevage, à 50 kilomètres environ en aval de Gao, on nous apprend que 11 juments poulinières sont mortes depuis un an. Parmi celles qui restent, la plupart ont déjà avorté. Quelques poulains présentés sont en mauvais état et plusieurs paraissent avoir leurs jours comptés.

Sur l'un de ces derniers, âgé de 2 ans, en état de maigreur accusée, on remarque une légère parésie de l'arrière-main: la conjonctive est blanc porcelaine; l'examen du sang permet d'apercevoir quelques rares Trypanosomes.

L'affection est désignée par les Songoï de la région sous le nom de *Tahaga*.

A. ÉTUDE EXPÉRIMENTALE SUR LE CHIEN.

№ 1. — Une chienne de 8 mois, originaire de Gao, reçoit, le 17 avril 1905, dans le tissu conjonctif du pli du flanc, 5 c. c. de sang du poulain signalé plus haut. Le 8^e jour, la température s'élève à 40°,3, mais on ne peut apercevoir de parasites; ceux-ci ne se laissent surprendre, en petit nombre, que le 18^e jour. À partir de ce moment, on constate leur présence par périodes assez rapprochées; ils deviennent assez nombreux à la mort. La température se maintient entre 39° et 40° et elle est de 37°,5 à la mort.

Dès les premiers accès, on note de la tristesse et de l'inappétence; diarrhée verdâtre le 28^e jour; yeux chassieux. Au début du troisième mois, se montre, à gauche, une kératite qui se développe insensiblement; 15 jours plus tard, la cornée droite est prise à son tour.

En fin juillet, les kératites sont totales. Le 17 août, on note une large plaque œdémateuse sur le dos et le rein, qui persiste pendant quelques jours. Dans les derniers jours, l'animal, très triste, est constamment couché; la mort se produit le 133^e jour (29 août 1905).

№ 2. — Le 1^{er} août 1905, on inocule un chien âgé de 7 mois, originaire de Ségou, en bon état d'entretien, avec 4 c. c. de sang prélevé sur le № 1, alors arrivé au 106^e jour de sa maladie.

1. A. LAVERAN. *Académie des Sciences*, 4 février 1907, et *Annales de l'Institut Pasteur*, mai 1907.

2. G. MARTIN, *Les Trypanosomiases de la Guinée française*, Paris, 1906.

3. THIROUX et TEPPAZ. *Les Trypanosomiases au Sénégal*, ces *Annales*, mars 1907.

4. A. LAVERAN, *Sur les Trypanosomiases du Haut-Niger*, ces *Annales*, mai 1907, et *Acad. des Sciences*, 29 juillet 1907.

Les premiers Trypanosomes, rares, apparaissent le 16^e jour, on les constate ensuite assez fréquemment; dans les derniers jours ils sont nombreux. Fièvre intermittente assez peu accusée, avec quelques maximums à 40°; le malade meurt le 75^e jour, à 34° 2.

On a noté une infiltration de la conjonctive le 18 août et un amaigrissement rapide.

Foie et rate légèrement grossis.

N^o 3. — Le même jour (1^{er} août 1905) on inocule une chienne de 8 mois, originaire de la zone endémique (Gao) avec 1 c. c. de sang du chien n^o 1. Les parasites apparaissent le 15^e jour, à 40° 8. Évolution sub-continue, mais Tryp. peu nombreux, plus abondants aux derniers jours. La température s'élève plusieurs fois à 40° — 40° 4, pour baisser sur la fin.

La mort survient le 120^e jour (28 novembre 1905) à 34°.

On a noté des vomissements bilieux assez pénibles, au moment de l'invasion, un amaigrissement rapide, de la diarrhée.

Rate de 70 grammes pour un animal de 8 k. 750.

N^o 4. — Une chienne de dix mois, en bon état, originaire de Korienza, est inoculée le 29 août 1905 avec 4 c. c. de sang du chien n^o 1, puisés à la mort, dans la jugulaire.

Incubation de 6 jours; évolution parasitaire semblable à celle du chien précédent; plusieurs accès fébriles avec une température de 40°-40°, 4. Dans les derniers moments, la température baisse et tombe à 34°, 6, à la mort, survenue le 91^e jour (27 novembre 1905).

On a noté une légère kératite à gauche, le 11 novembre, qui est totale le 24 novembre. Amaigrissement rapide.

Rate de 120 grammes; poids de l'animal : 6 k. 400.

N^o 5. — Un chien de 7 mois, originaire de Ségou, reçoit, à la mort du n^o 4, 2 c. c. de sang de ce dernier. Incubation de 5 jours; Trypanosomes nombreux à l'invasion, avec 39°, 5; à la mort, survenue le 7^e jour, la température est de 35°, 3.

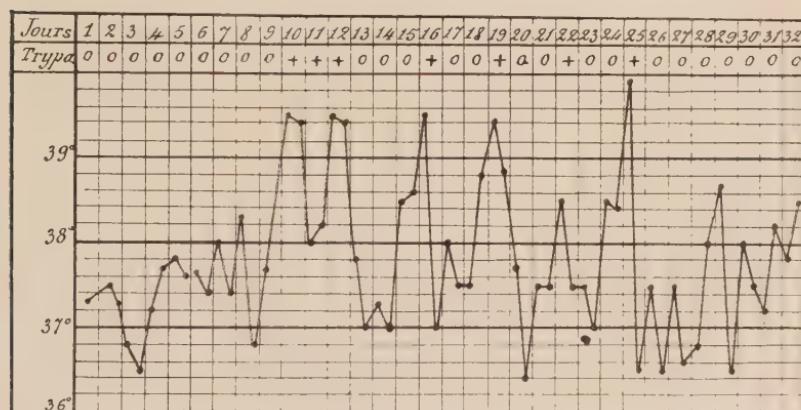
Rate : 20 grammes; poids de l'animal : 9 k. 400.

REMARQUES. — On peut faire ici des remarques semblables à celles qui ont été fournies par l'étude de *Tr. dimorphon*. Si le chien n^o 1, originaire de la zone endémique, inoculé sur le poulin de Gargouna, a succombé le 135^e jour, le n^o 4, originaire de Korienza, et inoculé à la mort du n^o 1, est mort le 91^e jour; — le n^o 5, originaire de Ségou et inoculé sur le précédent à la fin de sa maladie, a disparu le 7^e jour. Or, il est fort probable que la région de Ségou est indemne de *Tr. soudanense*; quant à la zone intermédiaire de Korienza, elle est peut-être en partie infectée.

Les n^os 2 et 3, inoculés sur le n^o 1, au 106^e jour de sa maladie, succombent, l'un de Ségou, au 75^e jour, l'autre de la zone d'endémicité, au 120^e jour seulement.

B. ÉTUDE EXPÉRIMENTALE SUR LE CHEVAL.

Un cheval de 3 ans, originaire de la région de Ségou, est inoculé, le 10 octobre 1905, dans la jugulaire, avec 1,5 c. c. du sang de la chienne n° 4.



Tahaga expérimental du cheval. — Premier mois de la maladie.

L'incubation est de 10 jours ; les parasites apparaissent assez nombreux, puis, on les constate au moment des hyperthermies ($39^{\circ}5$ — 40).

Comme symptômes, on a noté un léger larmoiement intermittent, quelques pétéchies en décembre. Le 27 du même mois, on remarque une éruption papuleuse légère, siégeant en diverses régions du corps et rappelant de très près celle que nous avons décrite dans la Mbori¹. L'amaigrissement sensible en décembre, se poursuit régulièrement jusqu'à la mort, arrivée le 240^e jour (8 juin 1906).

Comme on le voit, le tableau symptomatique a été discret et, au point de vue clinique, il donne l'idée d'une Mbori atténuée.

Un jeune chien, inoculé à notre départ de Ségou (mars 1906) sur ce cheval, est arrivé guéri à l'Institut Pasteur. Il est probable que la quantité de sang employée (3 c. c.) a été insuffisante à provoquer l'infection.

C. ÉTUDE EXPÉRIMENTALE SUR LE RAT GRIS.

Chez le rat, l'évolution parasitaire du Tahaga expérimental, rappelle celle de la Mbori : dès l'invasion, les parasites sont nombreux et leur nombre augmente jusqu'à la mort.

Deux rats, inoculés dans le pli du flanc, présentent une incubation de 5 et 7 jours ; ils succombent les 13^e et 21^e jours. Un rat, n° 3, inoculé dans la même région, a une incubation de 8 jours et meurt le 19^e jour ; mais le n° 4, inoculé sur le précédent à la mort, succombe le 7^e jour.

1. L. CAZALBOU, Le Surra en Afrique, *Revue g^{re} de m^{ed}. vétér.*, 15 oct. 1906.

6 autres rats meurent les 42^e, 48^e, 47^e, 49^e, 45^e, 46^e jours après l'injection du virus, et après une incubation variant de 6 à 8 jours. Tous ont été inoculés sur le cheval cité plus haut (sauf le n^o 4), dans le même mois.

2. — *Trypanosoma soudanense. Deuxième série.*

A notre passage à Gao (19 avril 1905), sur 5 dromadaires existant dans les troupeaux de ce poste (2 âgés et 3 jeunes), l'un des jeunes venait de mourir.

Les quatre qui restent sont très amaigris ; ils sont couverts de stomoxes, ainsi d'ailleurs que les bœufs et les chevaux de la région ; les cinq dromadaires sont présents à Gao depuis au moins un an et demi.

Chez ces malades, en dehors de l'amaigrissement progressif, on n'a constaté qu'un peu de larmoiement intermittent.

A. ÉTUDE EXPÉRIMENTALE SUR LE CHIEN.

N^o 1. — Du sang prélevé à la veine de l'éperon d'un jeune dromadaire est inoculé, le 19 avril 1905, dans le pli du flanc, à une chienne de 8 mois originaire de Gao et sœur de la chienne n^o 1 de la série précédente.

L'incubation est de 16 jours ; l'invasion se révèle le 4 juin suivant par la présence d'assez nombreux parasites, à 39°,5. La température s'élève à plusieurs reprises à 40° en août, à 40°,5 en septembre. Elle s'abaisse brusquement dans les derniers jours, et, au moment de la mort, elle est à 34°,5. La fin se produit le 6 octobre 1905, au 171^e jour.

L'évolution parasitaire, sub-continue dans les premières périodes, devient ensuite permanente.

On a noté comme symptômes ; des vomissements et des plaintes, du larmoiement, le 9 juin ; une ophtalmie externe avec kératite, le 8 juillet ; une plaque œdématueuse sur le rein et un œdème de la paupière droite, le 10 août ; un œdème de la vulve, les jours suivants. On a également remarqué une arthrite du carpe droit, du 23 août au 10 septembre, un œdème marqué de la croupe et de la base de la queue (10 septembre) des kératites généralisées, le 15 septembre ; en octobre, du larmoiement bilatéral prononcé. Affaiblissement marqué, plaintes fréquentes, légère inconscience, légère hyperesthésie cutanée. La malade est abattue, *in extremis*, le 6 octobre 1905.

Rate triple du volume normal.

N^o 2. — Le 1^{er} août 1905, on inocule un chien âgé de 8 mois, originaire de Dountzou, avec 4 c. c. de sang du chien n^o 1, arrivé alors au 188^e jour de sa maladie. Les parasites n'apparaissent que le 20^e jour, en petit nombre et à une température de 39°,5. D'abord assez peu nombreux,

ils sont ensuite fréquemment visibles. Quelques hyperthermies à 40°. Sur la fin la température s'abaisse et la mort survient le 8 mai 1906, au 269^e jour en hypothermie (34°).

On a noté une myosite des fléchisseurs de l'avant-bras, du 20 au 28 août. L'amaigrissement, progressif jusqu'en février, paraît s'arrêter pendant quelques semaines à cette époque et le malade reprend un peu d'embon-point, mais cette amélioration est assez éphémère.

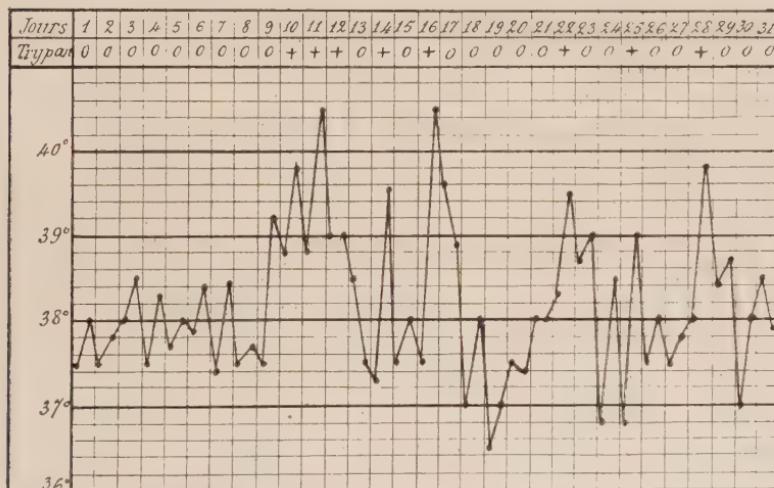
N° 3. — Un chien âgé de 7 mois, originaire de Niafunké, en bon état, est inoculé, le 1^{er} août 1905, avec 1 c. c. de sang du n° 1. Même évolution parasitaire et thermique. Le malade meurt le 138^e jour, à 35°, 4; la veille, on a noté 33°, 7.

Rate: 102 grammes pour un poids de 7 kilogr.

N° 4. — Chien de 5 mois, originaire de Ségou, en bon état, inoculé le 6 octobre avec 5 c. c. de sang du chien n° 1 prélevé à la mort, dans la jugulaire. Incubation de 40 jours; deux accès fébriles à 40°; mort le 29^e jour, à 35°.

Rate normale.

N° 5. — Chien de 3 mois, originaire de Ségou, en bon état. Reçoit, le 3 novembre 1905, 10 c. c. de sang du précédent, puisé à la mort, dans la



jugulaire. Le lendemain, la température s'élève à 40°, et tombe le deuxième jour, dans la soirée, à 34°. La mort se produit ici au bout de deux jours et demi.

N° 6. — Un chien de même âge que le précédent, né à Ségou, reçoit 10 c. c. de sang du n° 5, à la mort de ce dernier. Dans les premiers jours, on marque deux accès de fièvre à 40°, puis la température baisse régulièrement, atteint 34°. Le malade succombe à 36° le 16^e jour, avec des parasites nombreux.

B. ETUDE EXPÉRIMENTALE SUR LE CHEVAL

Un cheval de 3 ans, acheté à Ségou, en bon état, est inoculé dans la jugulaire, le 10 octobre avec un tiers de c. c. du chien n° 2. Il ne se produit pas d'infection.

Le 13 décembre, on injecte à nouveau, dans le même lieu, 4 c. c. de sang de même origine, assez riche en Trypanosomes.

Les parasites apparaissent le dixième jour, en assez grand nombre et puis aux hypertermies, en quantité variable.

On a constaté, de temps à autre, la présence de pétéchies; vers la fin janvier, une éruption papuleuse discrète, sur les régions supérieures du corps et à l'encolure. Amaigrissement progressif.

Le malade succombe au 154^e jour, à la date du 15 mai 1906.

Un chien originaire de Ségou est inoculé sur le cheval le 10 mars et arrive infecté à l'Institut Pasteur le 3 mai suivant; il meurt le 85^e jour (1).

C. ETUDE EXPÉRIMENTALE SUR LE RAT GRIS

Un rat n° 1, inoculé dans le tissu conjonctif avec quelques gouttes du sang du cheval, succombe le 14^e jour, avec des Trypanosomes nombreux; incubation de 6 jours. Un rat n° 2 meurt le 25^e jour, avec une incubation de 9 jours. Un rat n° 3, meurt le 42^e jour, un rat n° 4 est sacrifié *in extremis* le 46^e jour, mais son sang, inoculé à ce moment à un rat n° 5, provoque la mort au 9^e jour.

Nous voyons ici encore que l'inoculation pratiquée avec du virus prélevé au moment de la mort donne une augmentation de virulence.

Comparaison entre ces deux séries expérimentales.

L'étude des deux séries expérimentales effectuées avec le Trypanosome des chevaux de Gargouna, d'une part, et avec le Trypanosome des dromadaires de Gao, d'autre part, autorise à penser qu'il s'agit d'une même espèce parasitaire. Au point de vue morphologique, on ne peut distinguer ces deux parasites l'un de l'autre. Au point de vue clinique, il n'existe pas de différence appréciable dans les manifestations offertes, soit chez le cheval, soit chez le chien ou le rat gris du Soudan.

Dans ces deux séries, parfaitement comparables et synthétisées dans le tableau ci-dessous, on peut, de plus, remarquer:

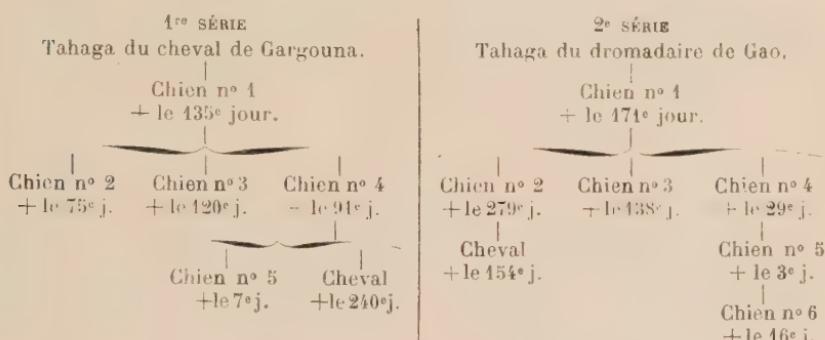
1^o Que les chiens de la zone d'endémicité (vallée saharienne du Niger) présentent une évolution très longue de la maladie;

2^o Que les chiens originaires des régions soudanaises offrent une résistance bien moins accusée, surtout quand les inoculations sont faites avec du sang prélevé au moment de la mort des malades, 1^{re} série, n° 5 — 2^e série, n°s 4, 5, 5;

1. A. LAVERAN, Sur les Trypanosomiases du Haut-Niger, ces *Annales*, mai 1907.

3^o Que sur les chiens inoculés avec du virus prélevé au cours de la maladie, on ne constate pas d'augmentation de virulence, quelle que soit l'origine des chiens mis en expérience.

1^{re} série, n^os 2 et 3, 2^e série, n^os 2 et 3.



On voit donc que, d'une manière générale, les chiens soudanais succombent à une évolution plus rapide que les chiens sahariens.

3^o *Trypanosome de la Mbori.*

(TR. EVANSI var.)

A. ETUDE EXPÉRIMENTALE SUR LE RAT GRIS

En 1903, à Ségou, trois chevaux sont inoculés de la Mbori du dromadaire de Tombouctou¹. Ce sont :

Caraiibe.....	Incubation de 5 j.	Mort le 436 ^e jour.
Pompon.....	— 40	— 307 ^e —
Condor.....	— 10	— 471 ^e —

Au cours du développement morbide, on pratique, chez le rat gris du Soudan, une série d'inoculations hypodermiques dont les résultats sont consignés dans le tableau suivant.

N ^o d'ordre.	Origine du virus.	Age de la maladie auquel le sang est prélevé.	Quantité de sang inoculée.	Date de la mort
Rat n ^o 4.....	Caraiibe.....	40 ^e jour.....		8 ^e jour.
— 2.....	—	40 ^e —		8 ^e —
— 3.....	Pompon.....	40 ^e —		8 ^e —
— 4.....	—	40 ^e —	de	8 ^e —
— 5.....	Condor.....	10 ^e —		8 ^e —
— 6.....	—	10 ^e —	quelques	8 ^e —
— 7.....	Caraiibe.....	12 ^e —		8 ^e jour 1/2.
— 8.....	Condor.....	15 ^e —	gouttes.	8 ^e —
— 9.....	Caraiibe.....	47 ^e —		9 ^e jour.
— 10.....	Pompon.....	89 ^e —	à un c. c.	27 ^e —
— 11.....	—	115 ^e —		22 ^e —
— 12.....	Condor.....	155 ^e —		19 ^e —
— 13.....	—	155 ^e —		48 ^e —

1. L. GAZALBOU, Le Surra en Afrique, *Rerue générale de médecine vétérinaire*
45 octobre 1906.

Ce tableau nous montre que le pouvoir virulent de la Mbori, pour le rat gris, s'atténue à mesure que se déroule l'affection chez le cheval producteur du virus.

En partant du rat n° 13, il a été possible de ramener la virulence à sa gravité première, par des passages en série dans cette même espèce, en ayant soin d'inoculer à la mort.

C'est ainsi que le rat n° 13 meurt le 48^e jour.

—	— n° 14	—	31 ^e	—
—	— n° 15	—	20 ^e	—
—	— n° 16	—	12 ^e	—
—	— n° 17	—	8 ^e	—

Rappelons qu'une augmentation sensible de virulence a été déjà obtenue avec le *Trypanosoma soudanense*, 1^{re} série, n° 4, 2^e série n° 5.

B. ETUDE EXPÉRIMENTALE SUR LE CHIEN

N° 1. — Chien âgé de 2 ans, en bon état, originaire de Tombouctou. Inoculé le 26 avril 1903 dans le tissu conjonctif hypodermique, avec 5 c. c. de sang largement parasité, prélevé sur un dromadaire atteint de Mbori.

DU 28 au 30 avril, engorgement œdémateux marqué de l'auge et de la gorge; parasites nombreux. À partir de ce moment, évolution intermittente des hématozoaires, visibles en grand nombre au moment des hyperthermies qui peuvent aller à 40^o,7.

L'engorgement de l'auge et de la gorge se reproduit les 42, 43 mai, les 23, 24 mai. Du 2 juin à la mort, en même temps qu'un œdème de la gorge, apparaît un volumineux engorgement du dos et des membres postérieurs. Pendant les vingt derniers jours, le malade est somnolent et constamment couché. Il succombe le 56^e jour en hyperthermie et dans un état de maigreur très avancée.

On trouve à l'autopsie une infiltration séreuse du tissu conjonctif au niveau des régions engorgées; les ganglions sous-glossiens, pharyngiens, pré-scapulaires, sous-lombaires, sont nettement grossis. Le foie et la rate paraissent normaux.

N° 2. — Chienne âgée de 8 mois, en bon état. Inoculée le 26 avril 1903 à Tombouctou avec 1 c. c. de sang riche en parasites provenant du même dromadaire que pour le numéro précédent.

Le 28 avril, apparaît un œdème de la gorge et, le 30 avril, les Trypanosomes deviennent visibles. L'œdème de la gorge se montre à nouveau du 9 au 12 mai, les 22 et 23 mai, du 3 au 5 juin, du 13 au 17 juin, du 25 au 28 juin et enfin le 30 juin.

Evolution parasitaire, marche de la température semblables à celles du chien précédent. Une ascite se développe le 50^e jour. La mort survient le 65^e jour.

A l'autopsie, on note un piqueté hémorragique sur le péritoine pariétal et viscéral, 300 c. c. de liquide épanché dans la cavité abdominale, légè-

ment trouble et grisâtre. Le foie et la rate paraissent normaux. Atrophie musculaire marquée, ganglions de l'auge fortement grossis.

N° 3. — Chienne de 8 mois, originaire de Ségou, atteinte de maladie du jeune âge, à la période de début.

Inoculée le 8 juillet 1903 avec 10 c. c. de sang provenant d'une antilope atteinte de Mbori expérimentale (voir *infra*). Ces Trypanosomes apparaissent le 11 juillet; on assiste à une évolution parasitaire continue et intense jusqu'à la mort, survenue le 30^e jour.

Amaigrissement rapide. Lésions de pleuro-pneumonie et d'hépatite pasteurelliennes: rate hypertrophiée et, par places, bosselée.

N° 4. — Chien âgé de 15 mois, originaire de Ségou, en excellent état. Inoculé le 10 août avec 5 c. c. de sang du cheval Caraïbe, dans le tissu conjonctif sous-cutané. Du 14 au 16 août, volumineux œdème de la gorge; apparition des parasites le 16 août; ensuite évolution abondante et sub-continue. Amaigrissement considérable.

Lésions: 50 c. c. de liquide rougeâtre dans la plèvre; sérosité dans le tissu conjonctif de la gorge et péri-trachéal; ganglions pharyngiens grossis; hypersplérie.

N° V. — Un chien, inoculé sur le rat n° 43, apporte le virus de la Mbori à Paris. Ce chien, originaire de Ségou, succombe le 65^e jour.

Nos A et B. — Deux chiens français, inoculés à Paris sur le chien n° 5, meurent en 12 et 17 jours¹.

En 1906, M. le Dr Jouvenceau, attaché à l'hôpital colonial de Tombouctou, que nous remercions ici de sa grande obligeance, voulut bien, sur notre demande, inoculer à des chiens du sang de dromadaires amaigris de Tombouctou. Six chiens de cette ville furent inoculés le 1^{er} janvier et expédiés à Ségou où ils arrivèrent le 20. L'un d'entre eux s'étant échappé quelques jours après et trois autres ayant succombé prématurément à la dysenterie contractée pendant le voyage en saison froide sur le Niger, nous ne parlerons ici que des deux cas restants.

Nos 6 et 7. — A leur arrivée au laboratoire de Ségou, on note des parasites nombreux; leur évolution est ensuite sub-continue et abondante, avec accès fébriles allant souvent à 40°; on remarque des kératites doubles et complètes; sur le n° 6, existe une iritis avec épanchement sanguin dans la chambre antérieure. Pas d'œdèmes; amaigrissement rapide.

Le n° 6 meurt le 69^e jour, le n° 7 le 76^e jour, avec une râte de 165 grammes pour un poids de 14 kilogs.

N° 8. — Un chien de 6 mois, de Ségou, est inoculé, le 9 mars 1906, sur le chien n° 6. Il succombe le 2 mai, au 55^e jour, en cours de transport de Marseille à Paris, ce qui n'a pas permis l'étude de ce virus en France.

Cependant, d'après les caractères morphologiques du Trypanosome et son action pathogène sur le chien, nous le considérons comme très voisin du parasite de la Mbori de 1903.

1. A. LAVERAN et F. MESNIL. *Trypanosomes et Trypanosomiases*, p. 195.

Le tableau ci-dessous résume ces expériences :

N ^o s d'ordre.	Origine.	Durée de la maladie.	Observations.
Chien n ^o 1.	Tombouctou....	56 jours.	Inoculés sur le dromadaire (1903).
— n ^o 2.	—	75 —	
— n ^o 6.	—	69 —	Inoculés sur le dromadaire (1906).
— n ^o 7.	—	76 —	
— n ^o 8.	Ségou.	53 —	Inoculés sur le chien n ^o 6.
— a.	Paris.	42 —	Inoculés sur le chien n ^o 5.
— b.	—	47 —	

Les résultats indiqués dans ce tableau nous montrent encore l'influence incontestable du pays d'origine sur le degré de la virulence. Si le virus passe par espèces différentes, le degré de virulence subit des modifications qu'il paraît difficile actuellement de classer.

Ainsi, un chien n^o 3, de Ségou, meurt le 30^e jour. Passages par antilope, cheval, chien, dromadaire;

Un chien n^o 4, de Ségou, meurt le 48^e jour. Passages par cheval, chien et dromadaire;

Un chien n^o 5, de Ségou, meurt le 65^e jour. Passages par rat n^o 13, cheval, chien, dromadaire.

CONCLUSIONS.

De l'ensemble de ces expériences effectuées avec trois espèces de trypanosomes, on peut tirer les conclusions suivantes :

1^o Les chiens originaires de la zone d'endémicité présentent une évolution chronique. Cette évolution revêt au contraire une forme aiguë chez les animaux de la même espèce appartenant à des régions probablement indemnes quand on inocule du virus prélevé au moment de la mort.

Ainsi *Trypanosoma dimorphon* qui existe en Gambie et en Guinée pourrait être rencontré dans toute la haute vallée du Niger, peut-être jusqu'aux portes de Tombouctou; mais il serait actuellement très rare dans la vallée saharienne de ce fleuve. D'une manière générale il existerait surtout, à l'état enzootique, dans les régions à tsétsé.

Trypanosoma Evansi (variété Mbori) et *Trypanosoma soudanense* seraient, pour les mêmes raisons, spéciaux aux régions sahélienne et saharienne.

On peut tenter d'expliquer ces faits en observant que les chiens, par l'ingestion des toxines incluses dans les débris cadavériques des animaux domestiques (dromadaire, cheval),

marchent vers l'état d'immunité dans la zone endémique, et que, dans les régions indemnes, ils conservent toute leur sensibilité pour le virus;

2^o La virulence se renforce par les passages en série dans une même espèce (rat gris) et de même origine (chien), à la condition que les inoculations soient pratiquées avec du sang prélevé au moment de la mort;

3^o Un animal atteint de Trypanosomiase, étant donné (cheval, chien) le degré de virulence pour une autre espèce, s'atténue avec l'évolution morbide;

4^o En séries désordonnées, la virulence semble subir des variations désordonnées.

